M N 44

# Über die Umsetzung von D-Fructose mit basischen Aminosäuren und ihre Beziehung zur nichtenzymatischen Bräunung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Helmut Noack
aus Berlin

Hamburg 1961

# Über die Umsetzung von D-Fructose mit basischen Aminosäuren und ihre Beziehung zur nichtenzymatischen Bräunung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Helmut Noack
aus Berlin

Hamburg 1961

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Genehmigt von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. Kurt Heyns.

Hamburg, den 9.12.1961

Kosswig
Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1959 bis August 1961 im Institut für Organische Chemie des Chemischen Staatsinstitutes Hamburg ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer
Herrn Professor Dr. Kurt Heyns
danke ich für die Themenstellung
und die immer hilfsbereite Unterstützung während der Ausführung
der Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548107_0049

Inhaltsübersicht.


Seite

A.) Einleitung..... 5

a.) Die Bräunungsreaktion..... 5

b.) Umsetzungen von Hexosen mit Aminosäuren und Aminen..... 7

c.) Umsetzungen von basischen Aminosäuren mit Kohlenhydraten..... 12

d.) Bedeutung der Modellreaktionen..... 13

B.) Die Umsetzung von L-Arginin mit D-Fructose.... 14

a.) Reaktionsprodukte in verschiedenen Lösungsmitteln..... 14

b.) Auftrennung der Reaktionsmischung..... 15

c.) Zuordnung und Eigenschaften der Reaktionsprodukte..... 16

d.) Struktur der isolierten Arginin-Zucker-Verbindungen..... 18

C.) Umsetzung von L-Histidin mit D-Fructose..... 20

a.) Die Reaktionsbedingungen..... 20

b.) Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung.... 21

c.) Zuordnung der isolierten Verbindungen und ihre Eigenschaften..... 22

D.) Umsetzung von L-Tryptophan mit D-Fructose..... 23

a.) Reaktionsprodukte von Tryptophan mit Carbonylverbindungen..... 23

b.) Reaktionen in verschiedenen Lösungsmitteln und Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen..... 24

Seite

c.) Struktur und Eigenschaften..... 26

E.) Verbindungen bei der Umsetzung von L-Lysin mit Hexosen..... 27

a.) Darstellung von α-D-Fructose-L-Lysin..... 27

b.) Auftrennung der Reaktionsmisschung von L-Lysin mit D-Glucose..... 27

c.) Die Struktur der erhaltenen Produkte..... 28

d.) Die Eigenschaften der isolierten Produkte. 29

F.) Diskussion..... 31

G.) Zusammenfassung..... 35

H.) Experimenteller Teil..... 37

I.) Literaturverzeichnis..... 48

I R - Spektren..... 52

U V - Spektrum..... 53

## A.) Einleitung.

### a.) Die Bräunungsreaktion.

Bei organisch-chemischen Reaktionen treten vielfach in mehr oder weniger großem Maße braune Produkte auf. In der Natur endet die Umsetzung der organischen Materie fast ausschließlich in braun bis intensiv schwarz gefärbten Stoffen, in Huminstoffen, Torf oder Kohle.

Bei der Verarbeitung oder Lagerung von Nahrungsmitteln tritt häufig eine Bräunung auf. In manchen Fällen ist diese Bräunung erwünscht. Sie führt zur Ausbildung von charakteristischen Geschmacks- und Aromastoffen, z.B. einer braunen Kruste beim Backen, beim Braten oder einer starken Aromabildung, wie beim Rösten von Kaffee. Die bei der Lagerung oder Konservierung von Lebensmitteln auftretende Bräunung durch Konzentrieren z.B. von Obstsäften oder bei der Herstellung von Milch- oder Eipulver ist in jedem Falle unerwünscht. Sie setzt den Wert und die Haltbarkeit der Nahrungsmittel herab. Der Wert wird dabei nicht nur auf Grund der äußeren Erscheinungsform gemindert, sondern es gehen tiefgreifende chemische Veränderungen vor. Vom Organismus im Stoffwechsel verwertbare Aminosäuren werden dabei in enzymresistente Verbindungen durch eine Reaktion mit Kohlenhydraten überführt.

J.E. Hodge (1) veröffentlichte 1953 eine Zusammenfassung der neueren Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Reaktionen zwischen Zuckern und Stickstoffverbindungen, die allein für den Zeitraum von 1940 bis 1953 rund 200 Literaturzitate umfaßt. Die wichtigsten Gesichtspunkte sollen hier kurz referiert werden.

Bei Nahrungsmitteln können als Ursache der Bräunung vier wichtigste Reaktionstypen unterschieden werden.

Der erste Typ ist die häufig bei Früchten auftretende enzymatische oder nichtenzymatische Bräunung von Polyphenolen wie Chlorogensäure, Dihydroxyphenylalanin und Tyrosin. Es handelt sich um eine oxydative Bräunung, bei der Phenole zu Polykarbonylverbindungen oxydiert werden, die zu tief dunklen Farbstoffen weitereagieren. Einen Überblick über diese meist enzymkatalysierten Reaktionen geben M.A. Joslyn und J.D. Ponting (2).

Der zweite Typ ist die Karamelisierung von Kohlenhydraten durch Erhitzen und die grundsätzlich in gleicher Weise verlaufende Bildung von Zuckercouleur mit höherer Konzentration der Bräunungsprodukte. Diese Reaktion erfordert meistens Temperaturen über 100° C und liefert je nach Reaktionsdauer und Temperatur braune bis schwarze, im Extremfall verkohlte Produkte. Als erste Stufe der Reaktion wird eine Anhydrid-Bildung angenommen, da z.B. aus Pyrolyseprodukten von Stärke Anhydroglucose als Baustein isoliert werden konnte (3). Durch Aminogruppen-Donatoren kann diese Umwandlung katalytisch beschleunigt werden **(siehe Typ 4).**

Als dritten Reaktionstyp kann man die thermische Umwandlung von Proteinen und ihrer Bausteine ansehen. Sie erfordert ebenfalls höhere Temperaturen. Dieses Gebiet ist sehr wenig bearbeitet. Es ist eine Studie von k.Heyns und K.Pavel (4) zu nennen. Darin werden die bei der Erhitzung von Glycin auf 260° - 280° C entstehenden Produkte untersucht.

Als vierter Typ hat die sog. Maillard-Reaktion für die bei der Lagerung und Verarbeitung von Nahrungsmitteln häufig auftretende Bräunung neben den vorstehend aufgeführten Reaktionen die größte Bedeutung. Man versteht darunter die unter Bildung von braunen Substanzen verlaufende Reaktion von Kohlenhydrat-Komponenten mit Amino-Verbindungen wie Aminosäuren, Peptiden und Proteinen.

Auch andere Aminogruppen-Donatoren einschließlich Ammoniak reagieren in ähnlicher Weise. Beide Substanzgruppen sind gemeinsamer Bestandteil der meisten Nahrungsmittel. Die Umsetzung verläuft unter viel milderen Bedingungen und bei wesentlich niedrigerer Temperatur als die beiden erstgenannten Typen. Bei sehr langen Reaktionszeiten, z.B. bei der Lagerung, kann sie schon bei Zimmertemperatur eintreten. Über die Maillard-Reaktion liegt eine große Zahl von Veröffentlichungen vor. Es sei hier auf die Zusammenfassungen von J.P. Danehy und W.W. Pigman (5) und die neuesten Übersichten von G.P. Ellis (6) und von K. Heyns und H. Paulsen (7) verwiesen.

Bei dieser Umsetzung reagiert in erster Stufe die primäre Aminogruppe der Aminosäuren mit der reduzierenden Aldehyd- oder Ketogruppe der Kohlenhydrate. 1912 führte L.C. Maillard (8, 9) die ersten Versuche zur Klärung dieser Vorgänge durch. Er erhitzte Glucose mit Aminosäuren, speziell mit Glycin, in wässriger Lösung bei verschiedenen Temperaturen und fand, daß während der Reaktion die Glucose dehydratisiert, Glycin unter $CO_2$-Abspaltung dekarboxyliert wurde. Aus dem von ihm als Endprodukt isolierten genau charakterisierten Melanoidin ließ sich kein Glycin durch hydrolytische Spaltung zurückgewinnen.

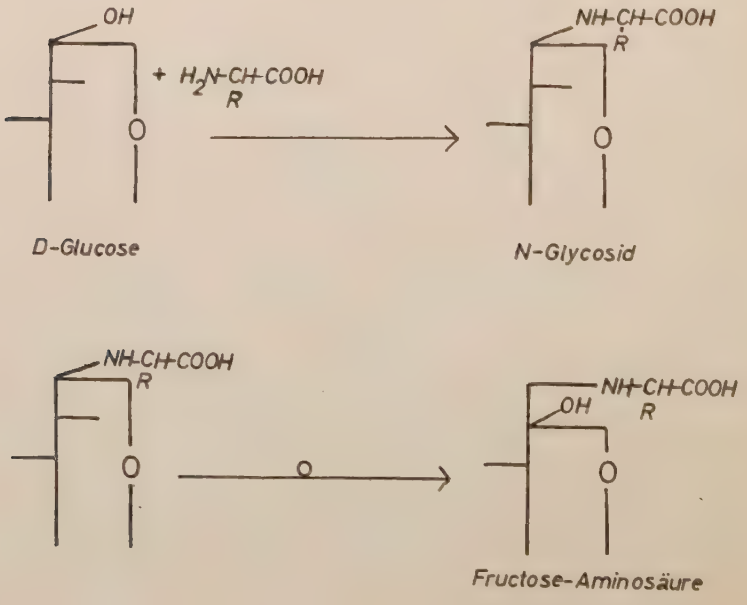
b.) Umsetzung von Hexose mit Aminosäuren und Aminen.

Maillard konnte keine definierten Zwischenprodukte fassen. Erst M.P. Schubert (10) isolierte 1939 bei der Umsetzung von Glucose mit Cystein Produkte, die sich ähnlich wie Thiazolidine verhielten, die sich bei der Kondensation von Cystein mit einfachen Aldehyden bilden. Von einer Cystein-Zucker-Verbindung, die Thiazolstruktur aufwies, berichtet 1940 G.Agren.

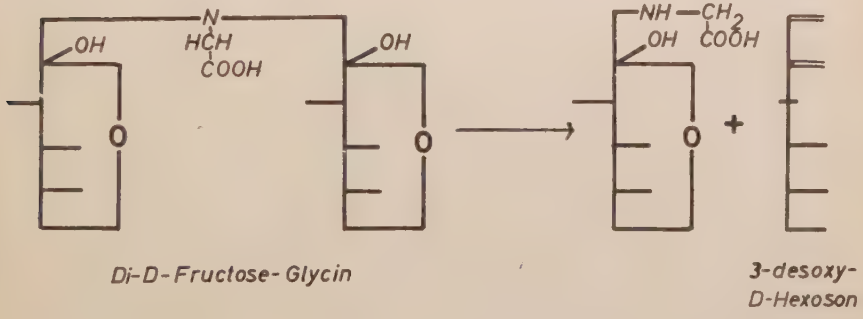
(11). 1941 stellten A.M. Kuzin und O.J. Polyakowa ( 12 ) die Calciumsalze von Glycin-Glucose-Verbindungen dar und 1951 erhielten F. Micheel und A. Klemer (13) die Natriumsalze einer Lysin-Glucose-Verbindung. Für beide Produkte wird eine N-Glycosid-Struktur angenommen. A. Gottschalck und S.M. Partridge (14) untersuchten die Produkte der Einwirkung von Lysin auf Glucose papierchromatographisch. Sie fanden reduzierende ninhydrinpositive Flecke.

Die erste stabile Aminosäure-Zucker-Verbindung, die 1-N-Phenylalanin-1-desoxy-D-Fructose, stellte 1952 A. Gottschalck (15) aus Phenylalanin und D-Glucose durch Amadori-Umlagerung als amorphes Produkt dar. Glucose bildet mit Aminosäuren zunächst ein N-Glycosid, das unter "Amadori-Umlagerung" zu 1-N-Aminosäure-1-desoxy-D-Fructose, kurz "Fructose-Aminosäure" genannt, umlagert. Diese abgekürzte Nomenklatur soll auch im folgenden benutzt werden.

Schema der " Amadori-Umlagerung " .



Bald darauf wurden dann eine große Zahl Aminosäuren mit D-Glucose umgesetzt und die entsprechenden Fructose-Aminosäure-Verbindungen ernalten (16 - 22). 1957 konnte Anet (23) Beobachtungen von Hodge bestätigen, nach denen mehrere Zuckermolekeln mit einer Aminogruppe in Reaktion treten können. Er isolierte Di-D-Fructose-Glycin aus D-Fructose-Glycin und D-Glucose. Diese Verbindung zeigt bereits bei Zimmertemperatur eine Spaltung, die einer Rückumlagerung sehr ähnlich ist, wie sie bei Aldose-Aminosäuren beobachtet wird. Beim Stehen in wässriger Lösung ($p_H$ 5,5) wird die Verbindung in 6 Tagen zu 50% aufgespalten unter gleichzeitiger Freisetzung d entsprechenden Menge D-Fructose-Glycin. 1960 gelang es Anet, den Verbleib des zweiten Zuckermoleküls zu klären (24). Es bildet sich das entsprechende 3-desoxy-D-Hexoson, das sich als sehr reaktionsfähig erweist.

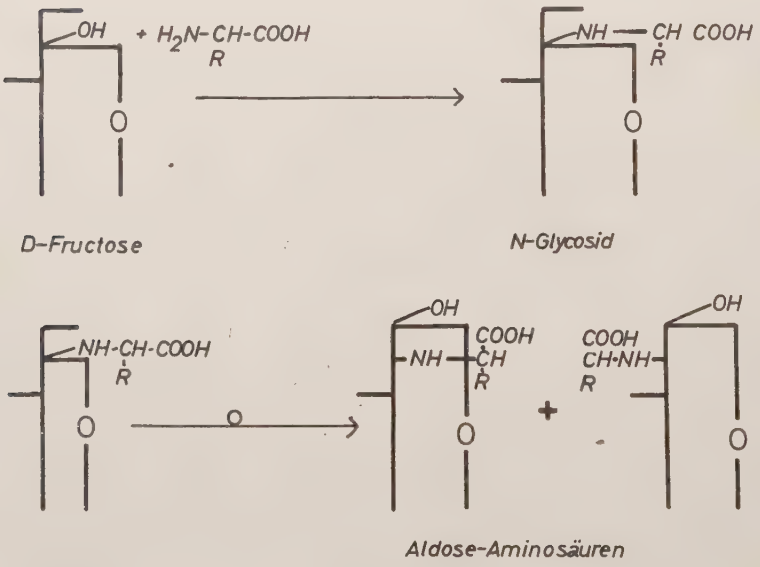



*Di-D-Fructose-Glycin* *3-desoxy-D-Hexoson*

Nach Anet soll das zurückbleibende D-Fructose-Glycin wieder mit neuer D-Glucose zu Di-D-Fructose-Glycin reagieren, welches wieder in D-Fructose-Glycin und das 3-desoxy-D-Hexoson zerfällt. Das D-Fructose-Glycin stände von neuem für den Kreislauf zur Verfügung und könnte beliebige Mengen Glucose in Bräunungsprodukte überführen (25).

Die Umsetzung von Aminosäuren und Peptiden mit D-Fructose wurde von K. Heyns und Mitarbeitern (22,26-30) untersucht. Im Gegensatz zur Reaktion mit D-Glucose, bei der nur ein Produkt erhalten wurde, können hier zwei isomere Verbindungen gewonnen werden. Bei der Reaktion bildet sich ein neues asymmetrisches Zentrum.

Schema der "Heyns-Umlagerung" (31).




Daneben entsteht auf einem noch nicht geklärten Wege die Fructose-Aminosäure-Verbindung, welche auch direkt aus D-Glucose und der entsprechenden Aminosäure darstellbar ist.

Die Entstehung des Amadoriproduktes bei dieser Reaktion wurde zunächst durch die Annahme einer vorgelagerten Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein-Umlagerung eines Teiles der D-Fructose zu D-Glucose und D-Mannose und deren weitere Umsetzung mit einer Aminokomponente erklärt.

Dagegen erhoben sich jedoch bald Bedenken (28), da teilweise große Mengen an Fructose-Amino-Verbindungen gebildet werden. Die Reaktionsbedingungen dürften ein solches Ausmaß der Fructose-Umlagerung kaum zulassen. Es wurde deshalb vorgeschlagen, die offenkettige Form der Fructose, die bekanntlich in sehr geringen Konzentrationen vorliegt, für das Auftreten des Amadori-Produktes verantwortlich zu machen. Diese offene Form, die nicht wie die Halbacetalform N-Glycoside bilden kann, sollte in Analogie zu dem Verhalten endständiger Ketole (62-64) in der Lage sein, über eine Schiff'sche Base die Fructose-Verbindung zu bilden. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion müßte allerdings recht groß sein, da trotz der geringen Konzentration der offenen Form der Fructose bemerkenswerte Mengen an Amadoriprodukt entstehen.

Gegen diese Anschauungen sprechen eine Reihe Versuche, die von R. Schumacher (32) durchgeführt wurden. Er erhitzte Glucose-Valin und L-Valin 18 Std. in Methanol am Rückfluß. Anschließend enthielt die methanolische Lösung neben Glucose-Valin auch Fructose-Valin, hingegen waren keine freien Zucker nachweisbar. Wenn einer der vorgenannten Wege in Betracht zu ziehen wäre, müßten in der Reaktionslösung die freien Zucker nachweisbar sein, da auch bei Umsetzungen mit einem Unterschuß von Kohlenhydraten stets unumgesetzter Zucker in der Reaktionslösung verbleibt. Der Befund, daß sich die Fructose-Aminosäure aus den Aldose-Aminosäuren bildet, konnte beim Arginin, Histidin und mit Vorbehalt auch beim Lysin bestätigt werden. Die Abhängigkeit des Fructose-Aminosäuregehaltes von der Reaktionsdauer spricht ebenfalls für eine Bildung aus den primär gebildeten Aldose-Aminosäure-Verbindungen.

Aromatische Amine, wie Anilin und seine substituierten Derivate und aliphatische Amine haben die Fähigkeit mit Kohlenhydraten N-Glycoside zu bilden. Allerdings verhalten sie sich bei der anschließenden intramolekularen

Umlagerung unterschiedlich. Die Umlagerung einer Aldosylverbindung (Amadori-Umlagerung) (33) führt zu einem einzigen Produkt, dem 1-N-Aminoketose-Derivat. Die Aldosylarylamine lagern sich bei Gegenwart katalytischer Mengen von Säuren leicht um (34), während bei Aldosylverbindungen aliphatischer Amine nur unter besonderen Bedingungen, unter dem Einfluß von aktiven Methylengruppen, schwachen organischen Säuren oder intramolekular gebundener Carbonylgruppen Umlagerungsprodukte isolierbar sind (17, 19, 35, 36). Die N-Glycoside von Ketosen verhalten sich im Vergleich dazu gegenläufig. Ketosylverbindungen von aliphatischen Aminen lagern sich leicht, zum Teil sogar spontan zu Aminoaldosen um (37). Die Heyns-Umlagerung kann zur Bildung der beiden am C-Atom isomeren Verbindungen führen. Der Verlauf der Umlagerung ist meist in einer Richtung bevorzugt. Dabei wird eine der isomeren Verbindungen meist als Hauptprodukt gebildet (38 - 41). Bei den aromatischen N-substituierten Ketosylaminen ist eine Umlagerung bisher nicht gelungen (42).

c.) Umsetzung von basischen Aminosäuren mit Kohlenhydraten.

H. Borsook (17) hat die basischen Aminosäuren L-Lysin, L-Arginin und L-Histidin mit D-Glucose umgesetzt und Fructose-Aminosäuren erhalten. Es wird jedoch nicht angegeben, welches Stickstoffatom der Aminosäuren substituiert wurde. Diese Frage ist aber für das im Folgenden dargelegte Problem von Wichtigkeit. Bei der Umsetzung von L-Lysin mit D-Fructose wurde eine D-Glucose-L-Lysin-, eine D-Fructose-L-Lysin-, eine D-Mannose-L-Lysin- und eine Di-D-Glucose-L-Lysin-Verbindung gewonnen (30). Über die Struktur dieser Verbindungen wird in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit diskutiert werden (siehe Seite 28). Soweit aus der Literatur ersichtlich war, wurde L-Tryptophan noch nicht mit Kohlenhydraten umgesetzt.

d.) Bedeutung der Modellreaktionen.

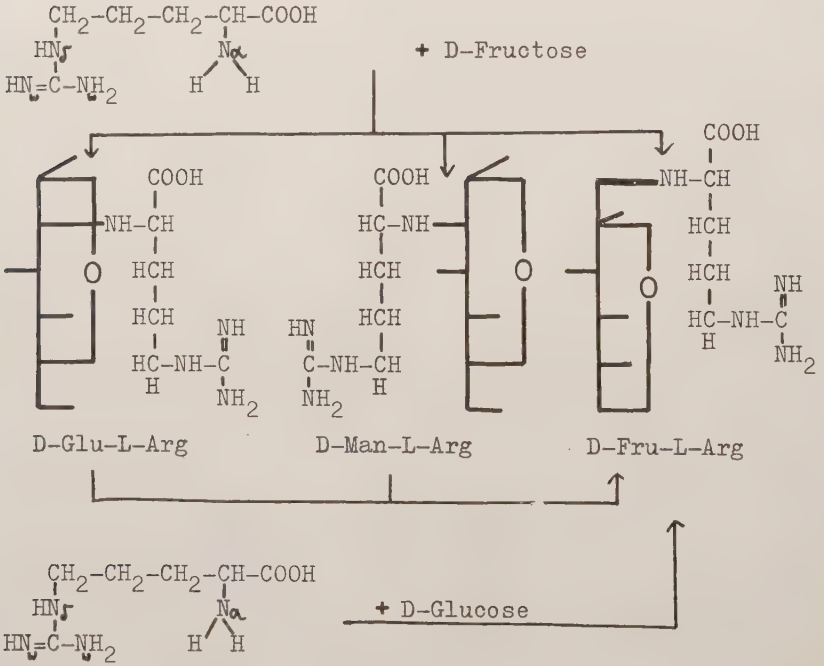
Proteine, z.B. in Nahrungsmitteln, besitzen nur wenige freie Aminogruppen, die für die Reaktion mit Kohlenhydraten zur Verfügung stehen. Von den vorhandenen freien primären Aminogruppen fallen z.B. in der Gelatine nur 8% auf Endgruppen und 92% auf ε-Aminogruppen des Lysins, welches innerhalb der Kette eingebaut ist. Daneben stehen nur die Guanidylgruppe des Arginins und die sekundären Aminogruppen der übrigen basischen Aminosäuren zur Verfügung. Ob diese Gruppen zur Reaktion mit Kohlenhydraten befähigt sind und somit für die Bräunungsreaktion bzw. für die Abnahme an den vom Organismus verwertbaren Aminosäuren verantwortlich gemacht werden können, soll durch die Modellreaktionen geklärt werden und ist der Gegenstand vorliegender Untersuchungen. Neben der Reaktion im Proteinverband spielt zweifellos die Reaktion der durch hydrolytische Spaltung frei vorliegenden Aminosäuren eine bedeutende Rolle.

B.) Die Umsetzung von L-Arginin mit D-Fructose.

a.) Reaktionsprodukte in verschiedenen Lösungsmitteln.

Arginin besitzt mehrere Stickstoffatome, die für eine Reaktion mit Kohlenhydraten in Betracht zu ziehen sind. Dabei unterscheiden sich die Stickstoffatome der Guanidylgruppe in ihren Eigenschaften erheblich von denen der α-Aminogruppe (Siehe Seite 34 ).

Reaktionsschema.



Alle Versuche wurden papierchromatographisch verfolgt. Methanol erwies sich als gutes Lösungsmittel. Es reagiert im Gegensatz zu Eisessig weder mit dem Zucker noch mit der Aminosäure und zeigt ein gutes Lösungsvermögen. Als günstigste Reaktionsbedingung ergab sich nach einer Reihe von Versuchen das Kochen des Reaktionsgemisches am Rückfluß. Es bildet sich eine stark braun gefärbte Lösung. α-D-Glucose-L-Arginin und α-D-Fructose-L-Arginin entstanden etwa im Verhältnis 1:1, während α-D-Mannose-L-Arginin in etwas geringerer Menge vorliegt. In Eisessig trat eine stärkere Bräunung, eine schlechtere Umsetzung und eine große Zahl von Zersetzungsprodukten der Fructose auf.

Bei den neutralen Aminosäure-Zucker-Verbindungen sind Unterschiede in der Basizität vorhanden, die die Auftrennung der Isomerengemische an Ionenaustauschern ermöglichten. Diese Differenzen sind durch das Vorhandensein weiterer Aminogruppen stark vermindert. Deshalb wird eine Trennung des Reaktionsgemisches außerordentlich erschwert. Bei den Darstellungen von L-Lysin-Hexose-Verbindungen (30) trat dieses Problem bereits auf.

Die Umsetzungen von L-Lysin mit D-Fructose zeigten, daß in Dimethylsulfoxyd das Verhältnis der Isomeren zu Gunsten der Glucose-Verbindung verschoben werden kann. Bei Versuchen mit L-Arginin wurde ebenfalls gefunden, daß in Dimethylsulfoxyd als Lösungsmittel fast ausschließlich α-D-Glucose-L-Arginin entsteht, wodurch die Aufarbeitung sehr erleichtert wird.

b.) Auftrennung der Reaktionsmischung.

Nach Borsook (17) ist es nicht möglich α-D-Fructose-L-Arginin von stark sauren Austauschern wie Dowex 50 zu eluieren. Dieses Ergebnis konnte auch nicht mit dem Isomerengemisch bestätigt werden. Es zeigte sich aber, daß man die Arginin-Zucker-Verbindungen von dem stark sauren

Ionenaustauscher Lewatit S 100 mit Trichloressigsäure eluieren und vom nicht umgesetzten L-Arginin trennen kann. Es tritt allerdings keine Auftrennung der Isomeren dabei auf. α-D-Glucose-L-Arginin besitzt in einem Pyridin/Amylalkohol/Wasser-Gemisch (40:30:37) einen $R_f$-Wert, der zwischen denen der beiden anderen Produkte liegt. Eine Auftrennung ist wegen der geringen $R_f$-Wertunterschiede erschwert. Sie gelang jedoch an Cellulosesäulen mit dem genannten Lösungsmittelgemisch. Aus dem Ansatz in Methanol erhielt man durch wiederholte Säulentrennung eine geringe Menge analysenreines α-D-Glucose-L-Arginin und α-D-Fructose-L-Arginin. α-D-Mannose-L-Arginin konnte zwar chromatographisch rein aber nicht analysenrein gewonnen werden.

| $R_{fru}$-Wert | Isomeren-Gemisch | Fructose-Arginin (17) | |
|---|---|---|---|
| o,35 | O | O | α-D-Fru-L-Arg |
| o,44 | O | | α-D-Glu-L-Arg |
| o,50 | O | | α-D-Man-L-Arg |

Günstiger liegen die Verhältnisse bei der Umsetzung in Dimethylsulfoxyd. Hier entsteht fast ausschließlich α-D-Glucose-L-Arginin. Nach der Abtrennung der Ausgangsprodukte gewinnt man die Aminosäure-Zucker-Verbindung entweder direkt oder durch Chromatographie an einer Cellulosesäule. Das erhaltene Produkt war analysenrein und besaß die gleiche optische Drehung, wie die aus dem Ansatz in Methanol erhaltene Substanz.

c.) Zuordnung und Eigenschaften der Reaktionsprodukte.

Die Zuordnung des α-D-Fructose-L-Arginin war auf Grund der für Amadoriprodukte charakteristischen Reaktionen einfach durchzuführen. Es reduziert in der Kälte eine

alkalische Lösung von Kalium-hexa-cyano-ferrat-(III) und gibt mit o-Dinitrobenzol eine Blaufärbung. Außerdem ließ sich die Verbindung nach Borsook (17) aus L-Arginin und D-Glucose direkt unter Amadori-Umlagerung darstellen. Das auf diesem Wege erhaltene -D-Fructose-L-Arginin war in allen Eigenschaften identisch mit dem im Chromatogramm am langsamsten laufenden Reaktionsprodukt.

Die Zuordnung der beiden anderen Produkte, die sich durch ihre Rückspaltung in L-Arginin und D-Fructose als Aldose-Verbindungen ausweisen, erfolgte auf Grund der spezifischen Drehung.

Die spezifischen Drehungen der Hexose-Aminosäuren.
(Lösungsmittel: Wasser)

| | D-Glucose- | D-Mannose- | D-Fructose- |
|---|---|---|---|
| Amin | +72,5 | -5,2 | -59 |
| Gly | +81 | -7 | -64 |
| L-Ala | +74 | --- | --- |
| L-Val | +65 | --- | -47 |
| L-Leu | +63 | --- | --- |
| L-Øala | +57 | --- | -33 |
| L-Glu | +48 | -10 | --- |
| L-Asp | +66 | -16 | --- |
| L-Pro | + 2 | --- | -92 |
| L-Try^^^ | +25 | --- | --- |
| L-His | +37 | --- | --- |
| L-Lys^ | +42 | ~ +10* | -28 |
| L-Lys^^ | --- | --- | -27 |
| L-Arg | +25 | ~ +3* | -13 |

^ ε-Substitution
^^ α-Substitution
^^^Lösungsmittel: 2n HCl.

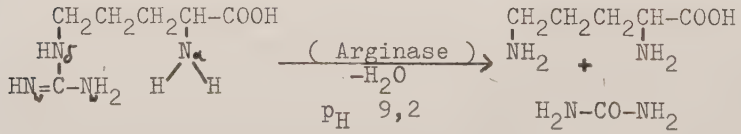
*Nicht analysenrein.

Alle Substanzen sind amorph, schwach hygroskopisch und wenig haltbar. Rückspaltung bzw. Zersetzung erfolgt schon beim Aufbewahren des getrockneten Sirups und beim Stehen in Lösung oder als Suspension nach der Fällung bei Zimmertemperatur. Dabei läßt sich bei α-D-Fructose-L-Arginin neben einer reduzierenden im Chromatogramm schneller laufenden Substanz Arginin nachweisen. Die von K. Maekawa und K. Ishimoto (43) beschriebene Säurespaltung der D-Fructose-L-Arginin-Verbindung in Arginin und D-Fructose kann nicht bestätigt werden.

Erhitzt man ein Gemisch von Aldose-Arginin und Arginin in Dimethylsulfoxyd unter den Bildungsbedingungen, d.h. 25 Tage im Brutschrank auf 37°C, so kann man α-D-Fructose-L-Arginin in der Lösung nachweisen.

d.) Die Struktur der isolierten Arginin-Zucker-Verbindungen.

Der Strukturbeweis für die isolierten Verbindungen stützt sich neben der analytischen Zusammensetzung und dem chromatographischen Verhalten, wie der Anfärbbarkeit, vor allem auf das Ergebnis der enzymatischen Spaltung mit Arginase. Arginase besitzt die Fähigkeit Arginin und Argininderivate in Ornithin und Harnstoff, bzw. deren Derivate zu spalten (44).




Eine gleichartige Spaltung ist bei an der α-Aminogruppe substituierten Zucker-Arginin-Verbindungen zu erwarten, z.B. bei α-D-Glucose-L-Arginin in D-Glucose-L-Ornithin und Harnstoff. Gelingt die Spaltung nicht, so weist dies auf eine Substitution am δ-N-Atom der Guanidylgruppe des Arginins. Entstehen zwei reduzierende Spaltprodukte, so

handelt es sich um eine Verbindung, die an der α-Aminogruppe und an einem ω-N-Atom der Guanidylgruppe substituiert ist.

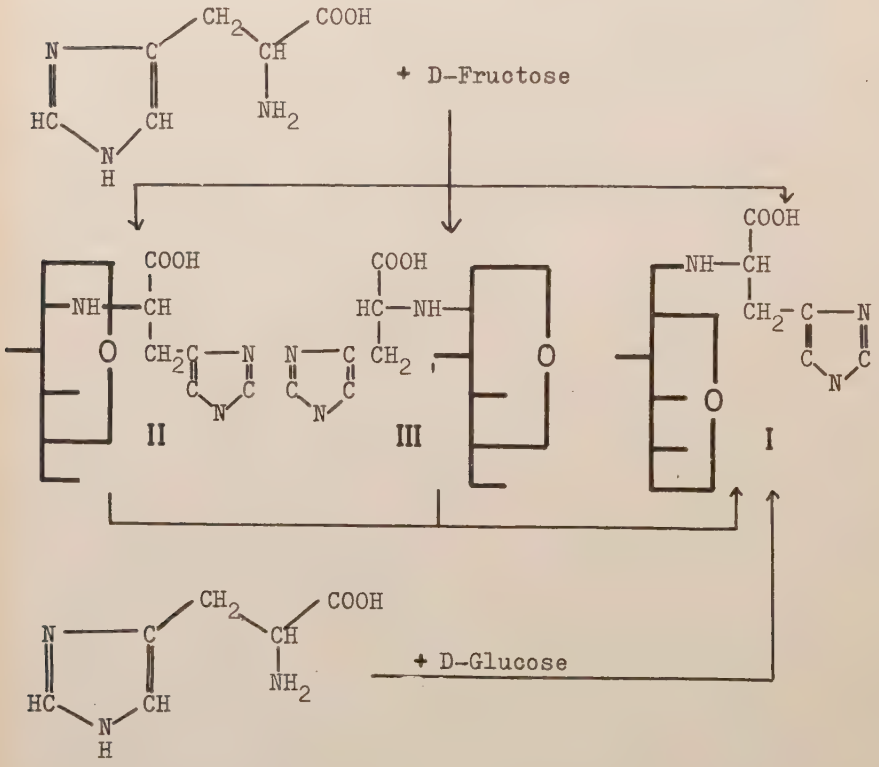
Die Untersuchungen der enzymatischen Spaltung mit Arginase der Verbindung α-D-Glucose-L-Arginin, α-D-Mannose-L-Arginin und α-D-Fructose-L-Arginin ergaben in jedem Fall Harnstoff und das entsprechende Ornithinderivat. Alle Produkte wurden papierchromatographisch nachgewiesen. Mit diesem Ergebnis stimmt überein, daß die drei isolierten Arginin-Zucker-Verbindungen nicht mit Ninhydrin reagieren, da die Aminogruppe besetzt ist.

Daraus ist zu schließen, daß unter den angegebenen Bedingungen nur die α-Aminogruppe mit Kohlenhydraten reagieren kann. Die Guanidylgruppe wird nicht durch Zucker substituiert.

C.) Die Umsetzung von L-Histidin und D-Fructose.

a.) Die Reaktionsbedingungen.

Es wurde zunächst versucht, L-Histidin mit D-Fructose in Methanol zur Reaktion zu bringen. Die Versuche wurden papierchromatographisch verfolgt. Nach kurzer Zeit löste sich die Mischung in siedendem Methanol völlig. Man erhält nach drei Stunden eine hellbraune Lösung, die sich äußerlich kaum noch verändert. Das Chromatogramm zeigt




Reaktionsschema der Umsetzung von L-Histidin mit Hexosen.

eine starke Bildung von α-D-Glucose-L-Histidin (II) und α -D-Fructose-L-Histidin (I) neben wenig α-D-Mannose-L-Histidin (III). Durch Variation des Lösungsmittels und der Reaktionsbedingungen wurde versucht, das Verhältnis der Reaktionsprodukte zu beeinflussen.

Unter milderen Bedingungen gewinnt man in Dimethylsulfoxyd ein Reaktionsprodukt, das fast nur aus α-D-Glucose-L-Histidin besteht. Ein Zusatz von Katalysatoren zu den Reaktionsansätzen war nicht erforderlich. Man erreicht damit nur eine verstärkte Dunkelfärbung, die sich bei der Aufarbeitung störend auswirkt.

b.) Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung.

Wegen der stark bevorzugten Bildung von α-D-Glucose-L-Histidin in den Dimethylsulfoxydansätzen galt es in erster Linie, das Reaktionsprodukt von den Ausgangsprodukten zu trennen. Diese Auftrennung war nicht möglich mit schwach sauren Austauschern. Vom stark sauren Ionenaustauscher Lewatit S 100 läßt sich L-Histidin zusammen mit der gesuchten Aminosäure-Zucker-Verbindung mittels Ammoniak eluieren. Das Verfahren ist jedoch sehr verlustreich. Die Isolierung von α-D-Glucose-L-Histidin gelang in analysenreiner und chromatographisch einheitlicher Form durch wiederholte Chromatographie an Cellulosesäulen, wobei mit einem Gemisch aus Pyridin/Wasser entwickelt wurde. Eine Auftrennung des Isomerengemisches, wie es bei den Ansätzen in methanolischer Lösung erhalten wird, ließ sich nicht erreichen. Durch Verminderung der Ammoniakkonzentration bei der Elution von Lewatit S 100 konnte chromatographisch eine Auftrennung nachgewiesen werden. Die Aufarbeitung der entsprechenden Fraktionen brachte keine isolierbaren Substanzmengen.

c.) Zuordnung der isolierbaren Verbindungen und ihre Eigenschaften.

Durch chromatographischen Vergleich der Reaktionsmischung in Methanol und Dimethylsulfoxyd mit aus D-Glucose und L-Histidin nach Borsook (17) dargestelltem α-D-Fructose-L-Histidin wurde α-D-Fructose-L-Histidin identifiziert. Außerdem gab es auf den Chromatogrammen die für Amadoriprodukte charakteristischen Reaktionen.

| $R_{fru}$-Wert ^ | Reaktionsprodukte in DMSO | Reaktionsprodukte in $CH_3OH$ | Fru-Hist (17) | |
|---|---|---|---|---|
| 0,21 | | | | α-Fru-Hist |
| 0,28 | | | | α-Glu-Hist |
| 0,40 | | | | α-Man-Hist |

α-D-Glucose-L-Histidin ordnete man auf Grund der spezifischen Drehung (siehe Seite 17) zu. Es läßt sich durch 2n Essigsäure im Einschlußrohr in Histidin und Fructose spalten. Die Substanz, die in amorpher Form erhalten wurde, hat eine schwach gelbliche Färbung. Erhitzt man α-D-Glucose-L-Histidin in Gegenwart von L-Histidin in Dimethylsulfoxyd 4 Tage auf 37°C, so bildet sich α-D-Fructose-L-Histidin. Da es sich bei der Verbindung nach Aussage der Elementaranalyse um eine monosubstituierte Substanz handelt, und da sie sich mit Ninhydrin nicht anfärben läßt, muß es sich um die α-substituierte Histidin-Zucker-Verbindung handeln.

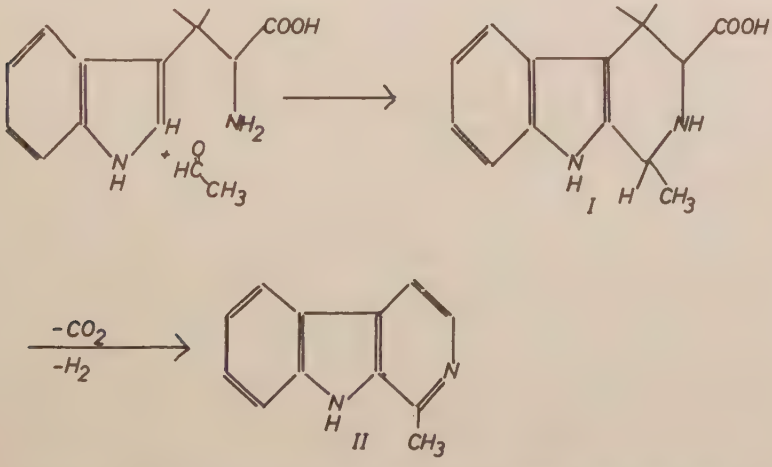
Auch hier konnten neben den beschriebenen weiter keine Produkte beobachtet werden. Eine Substitution der Ringstickstoffatome des Imidazols scheint unter den angegebenen Bedingungen ausgeschlossen (siehe Diskussion S. 33)

^Lösungsmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser (70:7:23)

D.) Umsetzung von L-Tryptophan mit D-Fructose.

a.) Reaktionsprodukte von Tryptophan mit Carbonylverbindungen.

Reines Tryptophan ist gegen Säureeinwirkung bei Luftausschluß relativ beständig. Bei gleichzeitiger Gegenwart von Carbonylverbindungen unterliegt es dagegen einer raschen Zersetzung, die zur Bildung von Huminstoffen führt (45).
Über erfolgreiche Kondensationen von Tryptophan mit Oxoverbindungen zu 2-Carbolinen ist in der Literatur verschiedentlich berichtet worden. W.O.Kermack, W.H. Perkin jun. und R. Robinson (46), H.R.Snyder und Mitarbeiter (47), D.G.Harvey und W. Robson (48), sowie W.A. Jacobs und L.C. Craig (49) setzten Tryptophan mit Acetaldehyd unter verschiedenen Bedingungen zur Tetrahydroharman-carbonsäure-(3) (I) um.




Durch Dehydrierung und Decarboxylierung kann sie in das 1-Methyl-2-carbolin (II) oder Harman übergeführt werden (46,48). D.G. Harvey und Mitarbeiter (50) bereiteten aus Tryptophan und Glyoxylsäure die Tetrahydronorharman-dicarbonsäure-(1,3). Tryptophan mit Formaldehyd liefert

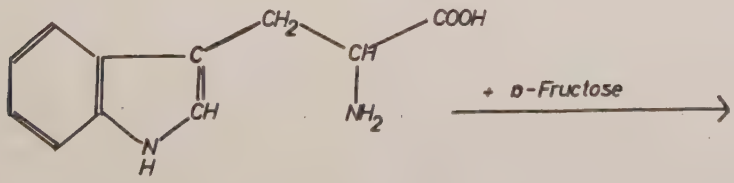
die Tetrahydroharman-carbonsäure-(3). R. Tschesche und H. Jensen (51) stellten Tetrahydroharman-dicarbonsäure-(1,3) durch Umsetzung von Tryptophan mit Brenztraubensäure dar. Diese Untersuchungen sollten Aufklärung bringen über das Verschwinden von Tryptophan bei der sauren Hydrolyse von Proteinen. Dabei entsteht Brenztraubensäure aus Serin nach einem von K. Heyns uns W.Walter (52) angegebenen Mechanismus. Auch die Anwesenheit von Acetaldehyd bei der Hydrolyse wird für diese Erscheinung verantwortlich gemacht. R.Tschesche und H. Jensen (53) setzten noch andere Verbindungen um, z.B. N-Propionyl-, N-Acetyltrytophan und Propionaldehyd. Tryptophan reagiert demnach sehr leicht mit Carbonylverbindungen verschiedensten Typus zu Tetrahydroharman-derivaten, die leicht zu Carbolinderivaten dehydrieren. Alle diese Verbindungen besitzen eine starke Fluoreszenz und eine für Carboline charakteristische Absorbtionsbande bei 360 mμ.

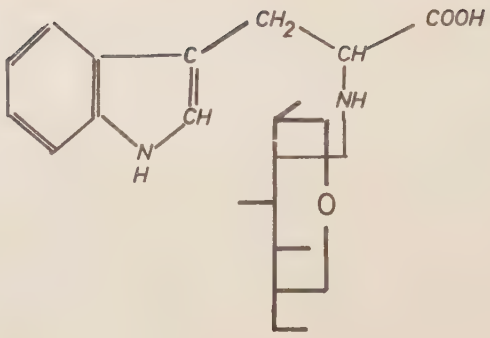
b.) Reaktionen in verschiedenen Lösungsmitteln und Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen.

Entsprechend der Empfindlichkeit des Tryptophans mußten besonders milde Reaktionsbedingungen gewählt werden. Frisch destilliertes Dimethylsulfoxyd oder wasserfreies Methanol erwiesen sich als am besten geeignete Lösungsmittel. Die Reaktionsmischung färbt sich im Brutschrank bei Verwendung von Dimethylsulfoxyd schnell dunkelbraun. In Methanol erhält man beim Kochen am Rückfluß eine weniger braun gefärbte Lösung. Bei beiden Umsetzungen nimmt der Gehalt an Tryptophan sehr schnell ab. Es läßt sich papierchromatographisch eine silbernitratpositive Substanz nachweisen. Auf dem Chromatogramm zeigt sich außerdem eine schwache Fluoreszenz im UV. Die Chromatogramme wurden mit den verschiedensten Lösungsmittelkombinationen entwickelt. Die Auftrennung in die zu erwartenden Isomeren gelang nicht. Durch Einsprühen mit für Amadoriprodukte charakteristischen Reagentien konnte die

Entstehung von α-D-Fructose-L-Tryptophan ausgeschlossen werden. Es wurde zunächst versucht, eine chromatographische Auftrennung eines Ansatzes in Dimethylsulfoxyd an Ionenaustauschersäulen zu erreichen. Ein wasserunlöslicher huminartiger Stoff mußte zuerst abfiltriert werden. Auf der Austauschersäule gelang eine vollständige Abtrennung der Ausgangsprodukte. Das Ergebnis war eine dunkelbraune Lösung, die sich durch Tierkohle nicht entfärben ließ. Bei der anschließenden Chromatographie an Cellulosesäulen mit wassergesättigtem n-Butanol kristallisierte α-D-Glucose-L-Tryptophan direkt aus dem Eluat. Die in der Mutterlauge zurückbleibende . uzierende Substanz kristallisierte aus Methanol, dabei wurde das Methanol zum Sieden erhitzt. Die Verbindung war nicht mit der zuerst isolierten identisch. Es handelt sich um den Methylester des α-D-Glucose-L-Tryptophans.

In einem weiteren Ansatz in Dimethylsulfoxyd wurde nach Abdestillieren des Lösungsmittels und Entfernen des huminartigen Stoffes die wässrige Lösung einige Tage stehen gelassen, worauf nach einiger Zeit das α-D-Glucose-L-Tryptophan quantitativ auskristallisierte. Ein weiterer Ansatz in Methanol lieferte in gleicher Weise beim Einengen oder Einfrieren kristallisiertes α-D-Glucose-L-Tryptophan. Es traten in beiden Ansätzen keine weiteren silbernitratpositiven Substanzen auf, so daß die Bildung des Esters als eine Sekundärreaktion bei der Aufarbeitung des ersten Ansatzes, der einer großen Zahl von Operationen unterzogen worden war, anzusehen ist.






c.) Struktur und Eigenschaften.

Wie schon erwähnt, konnte durch Sprühreagenzien auf dem Chromatogramm nachgewiesen werden, daß eine Fructose-Verbindung nicht entsteht. Eine Auftrennung des silbernitratpositiven Fleckes im Chromatogramm ist bei Anwendung der verschiedensten Lösungsmittelgemische nicht möglich. Die aus den drei Ansätzen isolierten Substanzen sind in allen Eigenschaften identisch, d.h. die aus dem Methanolansatz und aus den beiden Dimethylsulfoxydansätzen. Es ist daher anzunehmen, daß die anderen Isomeren wie α-D-Fructose- und α-D-Mannose-L-Tryptophan bei der Reaktion von L-Trytophan mit D-Fructose nicht entstehen. Die isolierten Substanzen sind kristallin und lassen sich aus Dimethylsulfoxyd/Wasser umkristallisieren. Diese Substanzen lösen sich in Säuren und sind in reinem Wasser unlöslich. In saurer Lösung sind sie wenig haltbar. Durch 2n Essigsäure werden sie in L-Tryptophan und Fructose gespalten. Auf Grund der Elementaranalyse sind sie als Mono-Aldose-Tryptophan-Verbindungen anzusprechen. Ihre IR und UV-Spektren sind identisch. Das UV-Spektrum ist charakteristisch für Indolderivate. Eine Carbolinstruktur ist also auszuschließen. Die Substanzen enthalten benachbarte Hydroxylgruppen, was leicht durch Besprühen des Chromatogramms mit K-perjodatocuprat (65) nach-

zuweisen ist. Da die Verbindung nicht mit Ninhydrin anfärbbar ist, muß es sich um eine α-substituierte Substanz handeln. Auf Grund der spezifischen Drehung wird sie als α-D-Glucose-L-Tryptophan angesprochen.
(siehe Seite 17)

E.) Verbindungen bei der Umsetzung von L-Lysin mit Hexosen.

a.) Darstellung von α-D-Fructose -L-Lysin.

Zur Darstellung von α-D-Fructose-L-Lysin ist es erforderlich, von einer Verbindung auszugehen, die an der leichter mit Kohlenhydraten reagierenden ε-Aminogruppe substituiert ist, und deren Schutzgruppe leicht wieder zu entfernen ist. Als Ausgangsprodukt diente ε-Carbobenzoxy-L-Lysin, das von A. Neuberger und F. Sanger (54) beschrieben wurde. Die ε-Cb-O-Verbindung wurde aus dem Kupferkomplex der Aminosäure gewonnen. Auf die Reinigung der Verbindung ist besondere Sorgfalt zu verwenden, da die Gegenwart von Kupferverbindungen die Kondensationsreaktion mit der Glucose unterbindet. ε-Cb-O-L-Lysin wird in Methanol in der Siedehitze mit D-Glucose umgesetzt. Dabei entsteht unter Amadori-Umlagerung ε-Cb-O-α-D-Fructose-L-Lysin. Die Trennung der Reaktionsmischung geschieht auf stark sauren Ionenaustauschern. Die Verbindung erhält man als Sirup. Der Cb-O-Rest wird mit Pd/Kohle-Katalysator abhydriert (54).

b.) Auftrennung eines Reaktionsgemisches von L-Lysin mit D-Glucose.

Bei der Auftrennung der Reaktionsmischung der Umsetzung von L-Lysin mit D-Fructose wurde festgestellt (30), daß die Befunde von H. Borsook, A. Abrams und P. Lowy (16) - nach denen D-Fructose-L-Lysin nicht vom stark sauren Ionenaustauscher Dowex 50 mit Trichloressigsäure eluierbar sein soll - nicht zutreffen können. Es gelingt auf

einer Ionenaustauschersäule eine vollständige Trennung der Reaktionsprodukte und der Ausgangsprodukte. H. Borsook und Mitarbeiter erwähnten bei ihrer Umsetzung die Bildung eines disubstituierten Produktes nicht. Chromatographische Untersuchungen der Reaktionsmischungen aus L-Lysin und D-Glucose zeigten deutlich die Entstehung von α,ε-di-D-Fructose-L-Lysin neben monosubstituiertem Produkt. Die Auftrennung geschah auf einer Ionenaustauschersäule, gefüllt mit Dowex 50, durch Eluieren mit Trichloressigsäure. Es gelang die vollständige Auftrennung der Reaktionsmischung in α, ε-di-D-Fructose-L-Lysin, ε-D-Fructose-L-Lysin und L-Lysin. Diese Trennung bedeutet eine wesentliche Vereinfachung der Darstellung dieser Verbindungen. Nach der üblichen Aufarbeitung der sauren Lösungen wurden beide Verbindungen als Dihydrochloride in chromatographisch- und analysenreiner Form als amorphe Pulver gewonnen.

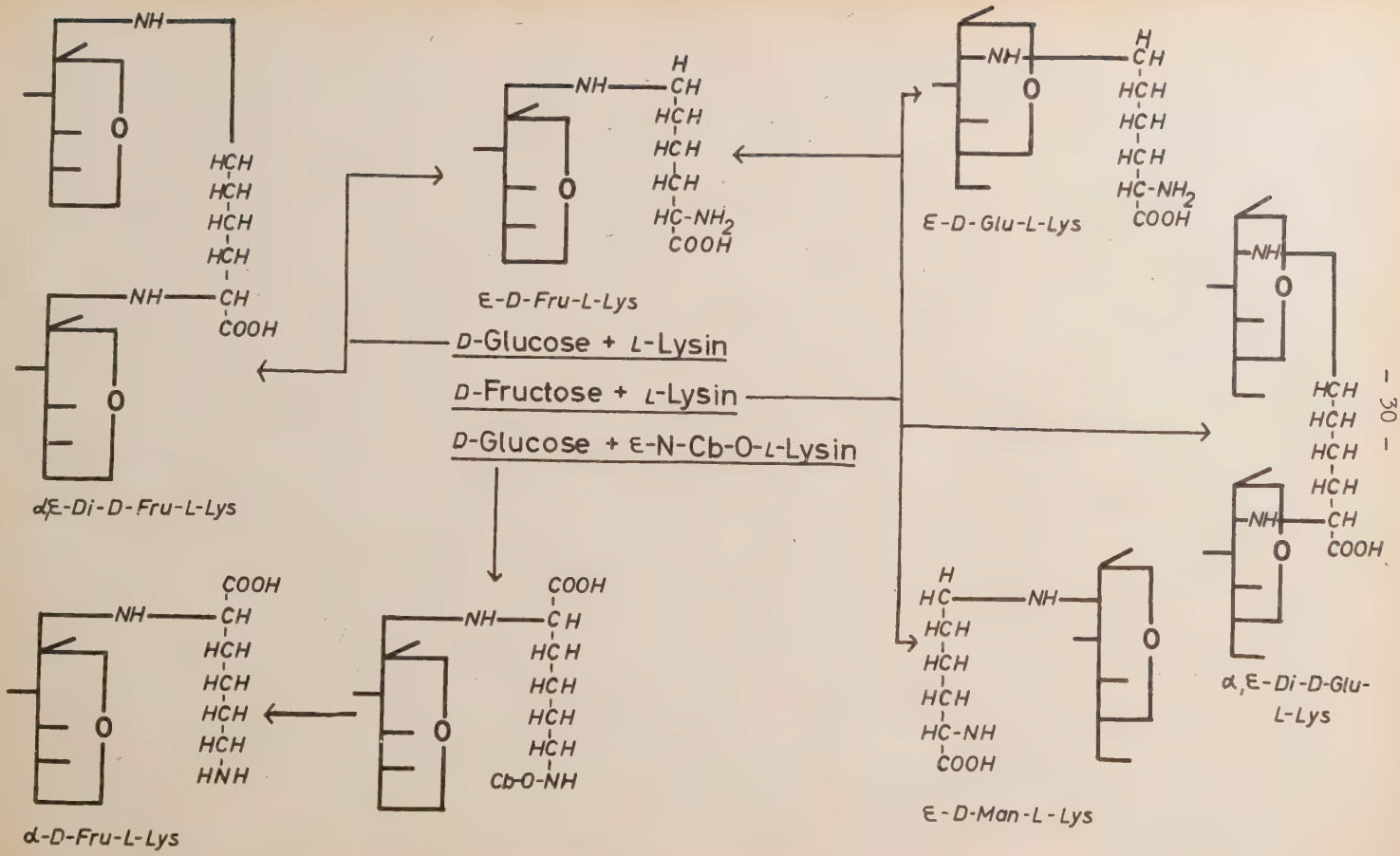
c.) Die Struktur der erhaltenen Produkte.

K. Heyns und Mitarbeiter zeigten (27, 28), daß ω-Aminogruppen, wie sie in der ε-Aminocapronsäure, γ-Aminobuttersäure und im β-Alanin vorliegen, schneller mit Kohlenhydraten reagieren als α-Aminosäuren. Für das bei der Umsetzung von L-Lysin mit D-Fructose (30) und für das von H. Borsook (17) aus L-Lysin und D-Glucose dargestellte D-Fructose-L-Lysin wurde deshalb ε-Substitution angenommen. Beide Produkte sind in allen Eigenschaften identisch. Für eine ε-Substitution spricht auch die veränderte Reihenfolge der Elution der Substanzen von Austauschersäulen und die Änderung der $R_f$-Werte, die sonst bei allen α-Aminosäure-Zucker-Verbindungen gleichartig gefunden wurde. Zur genauen Überprüfung der Struktur wurde als Vergleichssubstanz die α-D-Fructose-L-Lysin-Verbindung dargestellt. Diese Verbindung erwies sich als nicht identisch mit den direkt aus L-Lysin und D-Glucose und D-Fructose erhaltenen Fructose-Aminosäuren-Verbindungen. Sie zeigten

chromatographisch Unterschiede im $R_f$-Wert und in der Anfärbbarkeit mit Ninhydrin. Nach einer von P. O. Larsen und A. Kjaer (43) angegebenen Methode zur Unterscheidung von α-Aminosäuren und anderen ninhydrinpositiven Substanzen auf Papierchromatogrammen ließen sich α-D-Fructose-L-Lysin und ε-D-Fructose-L-Lysin im gleichen Sinne zuordnen. Dabei wird die Substanz auf dem Chromatogramm mit einer kupferkomplexbildenden Lösung behandelt. Bei der anschließenden Anfärbung mit Ninhydrin reagieren Aminosäuren mit freier α-Aminogruppe nicht mehr. Im vorliegendenFall ist nur die α-D-Fructose-L-Lysin-Verbindung ninhydrinpositiv.

d.) Die Eigenschaften der isolierten Verbindungen.

Mono-Hexose-L-Lysin-Verbindungen sind als Mono- und Dihydrochloride nur wenig haltbar. Sie neigen zur schnellen Bräunung und zerfließen alsbald zu einem Sirup. Bei längerem Stehen zersetzt sich der Sirup und ergibt einen weiteren ninhydrinpositiven reduzierenden Fleck im Chromatogramm. Die in der Mono-Verbindung noch vorhandene freie Aminogruppe dürfte in der Lage sein, eine Rückumlagerung zu katalysieren und die Labilität der Verbindungen zu fördern. Ist die zweite Aminogruppe ebenfalls mit einem Hexoserest besetzt, wie z.B. beim α,ε-di-D-Fructose-L-Lysin, so erhält man eine stabile, nur noch schwach hygroskopische Verbindung.


ε-D-Fru-L-Lys
ε-D-Glu-L-Lys
D-Glucose + L-Lysin
D-Fructose + L-Lysin
D-Glucose + ε-N-Cb-O-L-Lysin
α,ε-Di-D-Fru-L-Lys
α,ε-Di-D-Glu-L-Lys
α-D-Fru-L-Lys
ε-D-Man-L-Lys
Cb-O-NH

F.) Diskussion.

Reaktionen zwischen Aminosäuren und Kohlenhydraten sind von Bedeutung für die Beurteilung des biologischen Wertes des Nahrungseiweißes bezüglich ihres Gehaltes an basischen Aminosäuren (55). Besonders Lysin kommt als essentielle Aminosäure im Eiweiß des Getreides und in der Kartoffel in suboptimaler Menge vor. Bei der Verarbeitung, z.B. beim Backen oder Braten können Aminosäuren in der oben beschriebenen Weise verändert werden. Ein Teil derselben wird unter Bräunung weiterreagieren, wobei nach S. Sentneshanmuganathan (56) eine weitgehende Zerstörung der Aminosäure eintritt. Lysin ist in der Lage, schon im Protein mit seiner ε-Aminogruppe in Reaktion zu treten. Die so im Proteinverband enthaltenen Hexose-Aminosäure-Reste binden sicher einen erheblichen Teil des Lysins. Sie geben, soweit sie nicht der Bräunung unterliegen, durch enzymatische Hydrolyse des Gesamtproteins bei der Verdauung ε-D-Glucose-L-Lysin und ε-D-Fructose-L-Lysin frei, deren Verwertbarkeit durch den Organismus noch ungeklärt ist.

Die Bildung von Hexose-Lysin-Verbindungen bei der Umsetzung von Proteinen mit Hexosen ist verschiedentlich nachgewiesen worden. F. Micheel und A. Klemer (57) setzten Glucose mit Gelatine bzw. Pferdeserumalbumin um. Sie erhielten dabei ein Produkt, das 1,4% nicht hydrolysierbare Kohlenhydrate enthielt. K. Heyns und M. Rolle (58) brachten Gelatine mit Fructose unter verschiedenen Bedingungen zur Reaktion. Sie fanden, daß bei der Umsetzung in Dimethylsulfoxyd 50 - 60% und in Eisessig 15% der ε-Aminogruppen des Lysins unter Ketosylumlagerung zu ε-Glucose-L-Lysin reagieren. Das ε-Glucose-L-Lysin wird damit ein Baustein des auf diese Weise veränderten Proteins. Die saure Hydrolyse dieses Proteins liefert in der Tat als Spaltstück freies ε-D-Glucose-L-Lysin. Es ist identisch mit dem direkt aus Fructose und L-Lysin darge-

stellten Produkt (30). Nach den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich gewiß um das $\varepsilon$-substituierte Derivat.

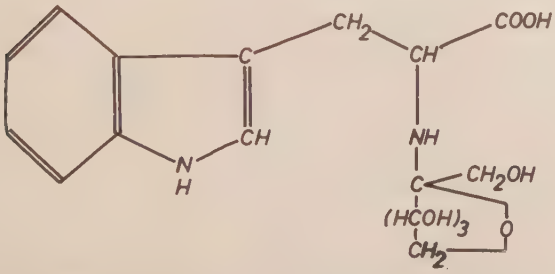
Damit ist erwiesen, daß die $\varepsilon$-Aminogruppe des Lysins in Proteinen mit Fructose in der gleichen Weise wie einfache Aminosäuren unter "Heyns-Umlagerung" zu entsprechenden Glucose-Aminosäure-Resten reagieren kann. Mit Glucose dürfte eine entsprechende Umsetzung zu Fructose-Aminosäure-Reste erfolgen. Es ist bisher nicht geklärt, ob es Enzyme gibt, die diese Hexose-Aminosäure spalten, ob diese über einen Rückumlagerungsmechanismus die Aminosäuren für den Organismus verwertbar machen können, bzw. ob sie durch diese Reaktion mit dem Kohlenhydrat verloren gehen (59).

Für Arginin, Histidin und Tryptophan, bei denen mit Glucose und Fructose nur eine Umsetzung der $\alpha$-Aminogruppe zu $\alpha$-substituierten Aminosäure-Zucker-Verbindungen erfolgt, ist eine Reaktion im Proteinverband nicht in Betracht zu ziehen. Hier ist die Umsetzung erst nach der hydrolytischen Freisetzung der Aminosäuren möglich. Dabei ist beim Tryptophan neben der Reaktion mit den Kohlenhydraten eine Umsetzung mit entstehenden Aldehyden und Brenztraubensäure (siehe Seite 24) zu erwarten (51 - 53).

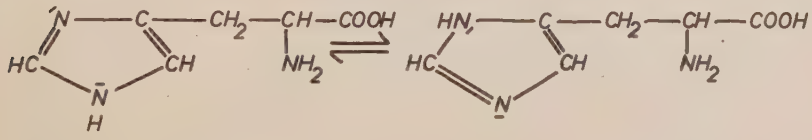
Die Ursachen für das Ausbleiben der Reaktion mit dem Ringstickstoff beim Tryptophan sind folgende. Das Tryptophan hat als Grundkörper das Indolsystem. Es handelt sich um ein sekundäres Amin. Nach H. Schroeder (22) reagieren aber sekundäre Amine bedeutend schlechter mit Fructose. Hinzu kommt, daß der benachbarte Benzolring der Verbindung den Charakter eines aromatischen Amins gibt. Reaktionen zwischen aromatischen Aminen und D-Fructose sind bisher nicht gelungen.

Carboline wurden bei der Reaktion von L-Tryptophan mit D-Fructose nicht isoliert. Der Ringschluß, der von der Fructosylverbindung ausgehen müßte, kann wegen des Feh-

lens einer reaktionsfähigen Gruppe am C-Atom 2 des in der cyclischen Form vorliegenden N-Glycosids nicht erfolgen. Die Reaktion müßte von der offenkettigen Form der Fructose ausgehen. Sie liegt aber nur in sehr geringer Menge vor und kommt durch die glatt verlaufende α-D-Glucose-L-Tryptophan-Bildung nicht zum Zuge. Die Ringschlußreaktion der umgelagerten Glucose-Verbindung würde zu einem siebengliedrigen Ringsystem führen.

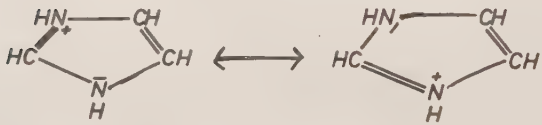



Beim Histidin liegt der Imidazolring mit einem Azastickstoff und einer sekundären Aminogruppe vor.

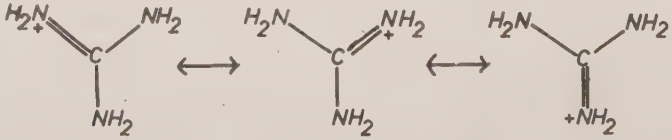



Bei Säureamiden, Pyrrol, Anilin und ähnlichen Verbindungen vermindert sich die Basizität durch Mesomerie. Der freien Base kommt bei diesen Verbindungen eine größere Mesomerieenergie zu als dem protonierten Kation. Als Folge der Mesomerie kann sich aber auch eine Erhöhung der Basizität ergeben. Sie tritt bei solchen Verbindungen auf, bei denen das protonierte Kation relativ zur freien Base in besonderem Maße durch Mesomerie stabilisiert ist. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn durch die Protonenaddition ein symmetrisches mesomeres Kation entsteht. Beim Imidazol erfolgt die Addition des Protons nicht an dem

sekundären Stickstoffatom, sondern an dem basischeren Azastickstoff, dessen Basizität etwas größer ist als beim Pyridin. Dies liegt in dem besonderen Bindungszustand der ungesättigten heterocyclischen Fünfringe begründet. Wegen der Einbeziehung des freien Elektronenpaares des sekundären Stickstoffatoms in das cyclische Konjugationssystem ist die Elektronendichte an den übrigen vier Ringatomen erhöht. Außerdem entsteht auf diese Weise bei der Protonierung ein völlig symmetrisches Kation, das durch eine besondere Stabilität ausgezeichnet ist. Dieser Mesomerieeffekt ist die Ursache für die erhöhte Basizität des Imidazolringes.



Ähnliche Verhältnisse ergeben sich beim Guanidin. Wegen der Mesomerie zwischen drei energetisch völlig gleichartigen Grenzstrukturen ist für dessen Kation eine besonders große Mesomerieenergie zu erwarten.



Es ist eine außerordentlich starke Base, die die Basizität der Alkalihydroxyde (60) erreicht. Das gleiche gilt für alkylsubstituierte Guanidine (61).

Aus diesen Erörterungen dürfte hervorgehen, daß eine unter Protonenabspaltung an der Aminogruppe verlaufende Reaktion durch die Mesomerie stark behindert sein wird. Folglich ist das Ausbleiben einer Umsetzung der Ringstickstoffatome bzw. der Guanidylgruppe mit Kohlenhydraten durchaus zu erwarten.

G.) Zusammenfassung.

Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Arginin in Dimethylsulfoxyd liefert α-D-Glucose-L-Arginin (2-N-α-L-Arginin-2-desoxy-D-Glucose). In Methanol entsteht ein Gemisch von α-D-Glucose-L-Arginin (2-N-α-L-Arginin-2-desoxy-D-Glucose), α-D-Fructose-L-Arginin (1-N-α-L-Arginin-1-desoxy-D-Fructose) und in geringer Menge α-D-Mannose-L-Arginin (2-N-α-L-Arginin-2-desoxy-D-Mannose), das mittels Säulenchromatographie aufgetrennt wurde. Die enzymatische Spaltung von α-D-Glucose-Arginin, α-D-Mannose-Arginin und α-D-Fructose-L-Arginin führt zu Harnstoff und Hexose-Ornithin-Verbindungen, womit die Stellung der Substitution der Hexosekomponenten an der α-Aminogruppe des Arginins bewiesen wird. Eine Reaktion der Guanidylgruppe des Arginins mit Hexosen erfolgt nicht.

D-Fructose reagiert mit L-Histidin in Dimethylsulfoxyd zu α-D-Glucose-L-Histidin (2-N-α-L-Histidin-2-desoxy-D-Glucose).

D-Fructose und L-Tryptophan setzen sich in Dimethylsulfoxyd sowie in Methanol ausschließlich zu α-D-Glucose-L-Tryptophan (2-N-α-L-Tryptophan-2-desoxy-D-Glucose) um, das ohne Säulenchromatographie in kristallisierter Form isoliert wurde. Eine Reaktion von Hexosen mit den Ringstickstoffatomen des Imidazol- und des Indolsystems des Histidins bzw. des L-Tryptophans tritt nicht ein.

Bei der Reaktion von D-Glucose mit L-Lysin wurde α, ε-Di-D-Fructose-L-Lysin (1-N-α, ε-L-Lysin-1-desoxy-di-D-Fructose) neben ε-D-Fructose-L-Lysin (1-N-ε-L-Lysin-1-desoxy-D-Fructose) erhalten. Die Struktur der monosubstituierten Lysinderivate konnte durch Vergleich mit α-D-Fructose-L-Lysin (1-N-α-L-Lysin-1-desoxy-D-Fructose) sichergestellt werden. α-D-Fructose-L-Lysin

wurde durch Umsetzung von ε-Carbobenzoxy-L-Lysin mit D-Glucose und anschließende hydrogenolytische Abspaltung der Carbobenzoxygruppe dargestellt.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß nur L-Lysin in der Lage ist, schon im Proteinverband mit der ε-Aminogruppe mit Kohlenhydraten zu Hexose-Aminosäure-Verbindungen zu reagieren. Die anderen basischen Aminosäuren können sich erst nach der Hydrolyse mit Hexosen umsetzen.

H.) Experimenteller Teil.

Die Papierchromatogramme wurden auf Schleicher & Schüll Papier 602 h:p ausgeführt. Angefärbt wurde durch Besprühen mit ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung , mit Ninhydrin in wassergesättigtem n-Butanol, mit Chlor/o-Toluidin (66), mit Kalium-perjodatocuprat (65), mit alkoholischer o-Dinitrobenzol-Lösung (67) und mit dem auf Ketosen spezifischen Harnstoff-Phosphorsäure-Reagenz (68). Bevor die Pyridin/Amylalkohol-Chromatogramme mit der ammoniakalischen Silbernitrat-Lösung eingesprüht werden, müssen sie mit Eisessig behandelt werden. Ohne diese Vorbehandlung färbt sich das Papier braun. Die Flecken sind nur sehr undeutlich zu sehen.

Als Lösungsmittelgemische wurden für die Arginin-Zucker-Verbindungen Pyridin/Amylalkohol/Wasser (40 : 30 : 37) absteigend verwendet. Die Laufzeit beträgt 2 Tage. Die Histidin- und Lysinderivate wurden in n-Butanol/Eisessig/Wasser (70 : 7 : 23) (69, 70) absteigend 2 bzw. 3 - 4 Tage entwickelt. Die Chromatographie der Tryptophanderivate wurde im gleichen Gemisch durchgeführt. Bessere Ergebnisse erzielt man durch Entwicklung mit wassergesättigtem Methyläthylketon/n-Propanol/Wasser (4 : 1 : 1) aufsteigend.

Zur Isolierung der Produkte aus den trichloressighaltigen Lösungen wurde im Extraktionsapparat nach Kutscher-Steudel mit Äther extrahiert und im Vakuum eingeengt. Es wurde erneut ausgeäthert und zum Sirup eingeengt. Im Falle der Lysin-Zucker-Verbindungen wurde die Lösung vor der letzten Extraktion mit etwas konzentrierter Salzsäure versetzt. Man erhielt auf diese Weise reine Dihydrochloride. Das Pyridin und der Amylalkohol wurden aus den Lösungen ebenfalls durch Extraktion weitgehend entfernt. Dabei ist vorher so viel Wasser zuzugeben, daß die Lösung nicht mehr mit Äther mischbar ist. Ein längeres Stehen-

lassen der pyridinhaltigen Lösungen bei Zimmertemperatur ist zu vermeiden.

Der Sirup wurde durch Tierkohle entfärbt. Aus der methanolischen Lösung fiel durch Versetzen mit Isopropanol bis zur Trübung und anschließende Ätherzugabe ein weißer, amorpher Niederschlag aus, der meist durch erneute fraktionierte Fällung rein erhalten wurde.

Trennung des Isomerengemisches bei der Umsetzung von L-Arginin mit D-Fructose in Methanol.

5 g fein gepulvertes L-Arginin-Hydrochlorid und 50 g getrocknete D-Fructose wurden 3,5 Stunden in 500 ml trockenem Methanol am Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde langsam auf eine stark saure Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H -Form, 28 x 420 mm) gebracht. Es wurde mit destilliertem Wasser fructosefrei gewaschen und dann mit 1 n Trichloressigsäure eluiert. Alle sibernitratpositiven Fraktionen wurden vereinigt und aufgearbeitet. Man erhielt etwa 7 g Sirup. Der Sirup wurde in Wasser gelöst und unter Rühren mit Dowex 1 ($OH^-$-Form) versetzt bis der $p_H$-Wert 10 betrug. Es wurde abfiltriert und mit 100 ml Wasser nachgewaschen. Das Filtrat muß $Cl^-$-frei sein. 2,6 g des Sirups wurden auf eine Cellulosesäule (Chro Max, LKB) gegeben und mit Pyridin/Amylalkohol/Wasser (40 : 30 : 37) entwickelt. Das Eluat wurde in 25 ml Fraktionen aufgefangen und chromatographiert. Alle chromatographisch einheitlichen Fraktionen wurden vereinigt. Mit den uneinheitlichen Fraktionen mußte die Trennung wiederholt werden. So enthielten die Fraktionen 158 - 170 chromatographisch reines α-D-Glucose-L-Arginin. Nach der Aufarbeitung wurden 50 mg Substanz isoliert.

$C_{12}H_{24}N_4O_7$ ( 336,16 )

Ber.: N 16,66
Gef.: N 16,21

$R_{fru}$-Wert = 0,44 $[\alpha]_D^{20}$ : +25° (c=2,3; in Wasser)

Die Trennung der Cellulosesäule ist abhängig von der Homogenität der Säule.

1-N-L-Arginin-1-desoxy-α-D-Fructose ( α-D-Fructose-L-Arginin):

Aus den Fraktionen 175 - 192 konnten 80 mg α-D-Fructose-L-Arginin erhalten werden.

$C_{12}H_{24}N_4O_7$ ( 336,16 )

Ber.: C 42,87 H 7,14 N 16,66
Gef.: C 42,49 H 7,52 N 16,38

$R_{fru}$-Wert = 0,35 $[\alpha]_D^{20}$ : -13° (c=1,66; in Wasser)

2-N-L-Arginin-2-desoxy-α-D-Mannose ( α-D-Mannose-L-Arginin):

Aus den Fraktionen 112 - 120 konnten 17 mg nicht analysenreines α-D-Mannose-L-Arginin isoliert werden. Es gelang nicht, die Substanz zu reinigen. Die spezifische Drehung betrug:

$[\alpha]_D^{20}$ : ~ +3° $R_{fru}$-Wert = 0,50

Die Fraktionen 121 - 157 bestanden zum größten Teil aus α-D-Glucose-L-Arginin und wenig Mannosederivat. Die spezifische Drehung der Mischung betrug: $[\alpha]_D^{20}$ : +18°

Enzymatische Spaltung mit Arginase.

9 mg Aldose- bzw. Ketose-Arginin und 1,4 mg Arginase wurden in 1 ml Pufferlösung (Borax-Kaliumbiphosphat nach Kolthoff) bei $p_H$ = 9,2 eine Stunde auf 37°C erhitzt. Die Spaltprodukte wurden papierchromatographisch identifiziert. Als Reagenz auf Harnstoff diente p-Dimethylaminobenzaldehyd/ Salzsäure (72). Die Aktivität der Arginase betrug 20 "units per mg".

Die Bildung von D-Fructose-L-Arginin aus Aldose-Arginin.

5 mg Aldose-Arginin und 5 mg L-Arginin-Hydrochlorid wurden in 0,5 ml Dimethylsulfoxyd 25 Tage im Brutschrank auf 37°C erhitzt. Chromatographisch wurde α-D-Fructose-L-Arginin nachgewiesen.

2-N-α-L-Arginin-2-desoxy-D-Glucose (α-D-Glucose-L-Arginin)

5 g fein gepulvertes L-Arginin-Hydrochlorid und 50 g gut getrocknete D-Fructose wurden in 500 ml frisch destilliertem Dimethylsulfoxyd ca. 25 Tage - der genaue Zeitpunkt muß durch chromatographische Untersuchung ermittelt werden - im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Während sich das Arginin löste, färbte sich die Lösung braun. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum abdestilliert un der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen.

Die Lösung wurde auf eine Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, $H^+$-Form 25 x 380 mm) gegeben. Nach dem Waschen mit destilliertem Wasser wurde mit 1 n Trichloressigsäure eluiert. Alle reduzierenden Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und aufgearbeitet. Man erhielt 3 g Sirup. Der Sirup wurde in Wasser aufgenommen und durch Zugabe von Dowex 1 ($OH^-$-Form) - bis $p_H$ 10 - chloridfrei gemacht. Es wurde abfiltriert und mit ca. 100ml Wasser nachgewaschen. Die Lö-

sung wurde eingeengt. Ein Teil der Lösung gab man auf eine Cellulosesäule (Chro Max, LKB oder Whatman Nr. 1) und entwickelte mit Pyridin/Amylalkohol/Wasser (40 : 30 : 37). In den Fraktionen befand sich nur α-D-Glucose-L-Arginin. Nach der Fällung wurden 150 mg Substanz erhalten.

$C_{12}H_{24}N_4O_7$ ( 336,16 )

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ber.: | C | 42,87 | H | 7,14 | N 16,66 |
| Gef.: | C | 42,23 | H | 7,67 | N 16,37 |

$[\alpha]_D^{20}$ : $+25^\circ$ (c=2,1; in Wasser)

Wenn die Substanz nach der ersten Säulentrennung schon chromatographisch rein ist, kann auf die Cellulosesäule verzichtet werden. Die nach der Behandlung mit Dowex 1 eingeengte Lösung wird dann wie beschrieben gefällt.

2-N-L-Histidin-2-desoxy-α-D-Glucose ( α-D-Glucose-L-Histidin)

5 g L-Histidin-Hydrochlorid und 25 g D-Fructose wurden in 300 ml frisch destilliertem Dimethylsulfoxyd auf 37°C erwärmt. Die Umsetzung wurde papierchromatographisch verfolgt. Während der Entwicklung des Chromatogramms muß der Ansatz im Tiefkühlschrank aufbewahrt werden, um den Umsatz zu stoppen. Nach etwa 12 - 14 Tagen hat sich genügend Glucose-Histidin-Verbindung gebildet. Es darf nicht zu lange erwärmt werden, da sich sonst die Fructose-Verbindung bildet und die Trennung nicht gelingt. Das Dimethylsulfoxyd wird im Hochvakuum abdestilliert. Eine höhere Temperatur als 35°C muß unbedingt vermieden werden, um die Bildung von Fructose-Histidin nicht zu fördern. Der zurückbleibende Sirup wurde in wenig Wasser aufgenommen und auf eine Ionenaustauschersäule Lewatit S 100, H - Form, 25 x 450 mm) gegeben. Es wurde mit destilliertem

Wasser fructosefrei gewaschen und mit 0,5 n Ammoniak eluiert. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen. Nach der papierchromatographischen Untersuchung wurden alle reduzierenden Fraktionen vereinigt und aufgearbeitet. Man erhielt 5,5 g Sirup. 2,6 g wurden auf eine Cellulosesäule (Chro Max, LKB) gebracht und mit Pyridin/Wasser (3:1) entwickelt. Diese Trennung muß einige Male wiederholt werden. Bei geringen Mengen wurde auf Säulen - gefüllt mit Cellulosepulver Whatman Nr. 1 - zurückgegriffen. Es gelingt eine Trennung in α-D-Glucose-L-Histidin und L-Histidin. Geringe Spuren des Fructosederivates, die sich eventuell doch gebildet haben, gehen bei der recht verlustreichen Trennung verloren. Durch fraktionierte Fällung des auf diese Weise isolierten Sirups wurden 50 mg α-D-Glucose-L-Histidin erhalten.

$C_{12}H_{19}O_7N_3$ ( 317,30 )

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ber.: | C | 45,42 | H | 6,04 | N 13,24 |
| Gef.: | C | 45,23 | H | 6,36 | N 13,07 |

| | n-Bu/EE/W ^ 70:7:23 | Py/W ^^ 65:35 |
|---|---|---|
| α-D-Fructose-L-Histidin | 0,21 | 0,74 |
| α-D-Glucose-L-Histidin | 0,28 | 0,74 |
| L-Histidin | 0,4 | 0,46 |

^ $R_{Fructose}$-Wert

^^ $R_f$-Wert

$[\alpha]_D^{20}$ : +37° (c=2,4; in Wasser)

Die Bildung von α-D-Fructose-L-Histidin aus α-D-Glucose-L-Histidin.

5 mg α-D-Glucose-L-Histidin und 5 mg L-Histidin wurden in 0,5 ml Dimethylsulfoxyd 4 Tage auf 37°C erhitzt. Chro-

matographisch konnte α-D-Fructose-L-Histidin schwach nachgewiesen werden. Nach 14 Tagen war die Substanz völlig zerstört.

2-N-L-Tryptophan-2-desoxy-α-D-Glucose ( α-D-Glucose-L-Tryptophan).

5 g L-Tryptophan wurden mit dem 5 fachen Überschuß D-Fructose in 500 ml Dimethylsulfoxyd 5 Tage im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Die Lösung färbte sich stark braun. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum (ca 0,01 Torr) abdestilliert, der Sirup in Wasser aufgenommen und vom unlöslichen Rückstand abfiltriert. Die Lösung hat einen unangenehmen Geruch. Die wässrige Lösung wurde eingeengt und einige Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Es schied sich ein kristalliner Niederschlag ab, der aus Dimethylsulfoxyd/Wasser umkristallisiert wurde. Er ist in 2n Salzsäure löslich, in Wasser und Methanol unlöslich.

$C_{17}H_{22}O_7N_2$ ( 366,36 )

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ber.: | C | 55,73 | H | 6,05 | N 7,65 |
| Gef.: | C | 55,32 | H | 6,05 | N 7,61 |

$R_f$-Wert = 0,58 (Wassergesättigtes Methyläthylketon/n-Propanol/Wasser)

$[\alpha]_D^{20}$ : +25° (c=1,09; in 2n Salzsäure)

Umsetzung von L-Tryptophan mit D-Fructose in Methanol.

3 g L-Tryptophan und 30 g D-Fructose wurden in 450 ml wasserfreiem Methanol 3 Stunden am Rückfluß gekocht. Anschließend wurde die Lösung im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Es schieden sich 420 mg α-D-Glucose-L-Tryptophan ab. Nach Abdestillieren des Methanols und Abtrennen des wasserunlöslichen Niederschlages wurden weitere 510 mg erhalten.

$C_{17}H_{22}O_7N_2$ ( 366,36 )

Ber.: C 55,73 H 6,05 N 7,65
Gef.: C 55,48 H 6,32 N 7,53

$[\alpha]_D^{20}$ : +25° (c=1,52; in 2n Salzsäure)

Auftrennung der Reaktionsmischung durch Säulenchromatographie.

Nachdem der wasserunlösliche Niederschlag abgetrennt war, wurde die Lösung auf eine Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H -Form, 35 x 320 mm) gegeben und die Säule mit destilliertem Wasser fructosefrei gewaschen. Man eluierte mit 0,6 n TCE. Alle reduzierenden Fraktionen wurden vereinigt und aufgearbeitet. Der erhaltene Sirup - ca 6 g - war schwarz. Er ließ sich mit Tierkohle nicht entfärben. Zur Reinigung wurde er auf eine Cellulosesäule (Chro Max, LKB) gegeben und mit wassergesättigtem n-Butanol entwickelt. Die schwarzen Bestandteile wurden mit der Front eluiert. Aus den silbernitratpositiven Fraktionen kristallisierte α-D-Glucose-L-Tryptophan aus. Die Mutterlaugen wurden vereinigt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in siedendem Methanol aufgenommen. Es wurden 20 mg einer kristallinen Substanz erhalten, die nicht mit α-D-Glucose-L-Tryptophan identisch war. Es handelte sich um den Methylester. Die Esterstruktur konnte durch den Hydroxamsäuretest sichergestellt werden.

$C_{18}H_{28}O_9N_2$ ( 416,42 )
Die Substanz enthält zwei Moleküle Wasser.

Ber.: C 51,91 H 6,78 N 6,73
Gef.: C 52,00 H 6,79 N 6,72

$R_f$-Wert = 0,38 (MEK/n-Prop/W) (Methanolische Lösg.)

Die Substanz wurde über $P_2O_5$ getrocknet.

Einwaage: 5,12 mg
Auswaage: 4,75 mg
0,37 mg

Dies entspricht einer Abnahme von 2 Mol Kristallwasser.

Umsetzung von α-D-Glucose-L-Tryptophan mit L-Tryptophan in Dimethylsulfoxyd.

5 mg α-D-Glucose-L-Tryptophan und 5 mg L-Tryptophan wurden in 0,5 ml Dimethylsulfoxyd 5 Tage auf 37°C erwärmt. Der Gehalt an α-D-Glucose-L-Tryptophan hatte stark abgenommen. α-D-Fructose-L-Tryptophan konnte nicht nachgewiesen werden. Das gleiche Ergebnis wurde in Methanol erzielt.

1-N-L-Lysin-1-desoxy-α-D-Fructose-dihydrochlorid (α-D-Fructose-L-Lysin-dihydrochlorid).

4 g ε-Cb-O-L-Lysin-hydrochlorid (54) und 40 g D-Glucose wurden in 600 ml absolutem Methanol 6 Stunden am Rückfluß gekocht. Es wurde zur Trockne eingedampft, in wenig Wasser gelöst und vom Unlöslichen abfiltriert. Die Lösung wurde auf eine Ionenaustauschersäule (Lewatit S 100, H -Form, 28 x 350 mm) gegeben und mit destilliertem Wasser glucosefrei gewaschen. Die Aminosäure-Zucker-Verbindung wurde mit 0,5 n TCE eluiert. Alle reduzierenden Fraktionen wurden aufgearbeitet und 3,4 g Sirup erhalten.

Der Sirup wurde in 200 ml Äthanol, 40 ml Wasser und 40 Tropfen Eisessig gelöst. Es wurden 0,5 g Pd/Kohle-Katalysator zugegeben und hydriert (54). Nach der Aufarbeitung, bei der etwas konzentrierte Salzsäure zugesetzt wurde, erhielt man ca 1 g Sirup, der in der üblichen Weise gefällt wurde.

$C_{12}H_{26}N_2O_7Cl_2$ (381,26)

Ber.: C 37,8 H 9,1 N 7,34
Gef.: C 37,6 H 9,5 N 7,1

$R_{Lysin}$-Wert = 0,55

$[\alpha]_D^{20}$ : $-27^o$ (c=1,6; in Wasser)

1-N-L-Lysin-1-desoxy- $\alpha$, $\varepsilon$-di- D-Fructose-dihydrochlorid.
($\alpha$, $\varepsilon$-Di-D-Fructose-L-Lysin-dihydrochlorid).

8 g L-Lysin-dihydrochlorid und 50 g D-Glucose wurden in 750 ml trockenem Methanol 1,5 Stunden am Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das Methanol abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser gelöst und auf eine stark saure Ionenaustauschersäule (Dowex 50, $H^+$-Form, 28 x 450 mm) gegeben. Nach dem Waschen wurde mit 0,8 n TCE eluiert. Alle nur silbernitratpositiven Fraktionen wurden vereinigt und aufgearbeitet. Man erhielt ca. 10 g Sirup. Die Substanz wurde aus Methanol wie beschrieben gefällt.

$C_{18}H_{36}N_2O_{12}Cl_2$ (543,41)

Ber.: C 39,7 H 6,67 N 5,14
Gef.: C 40,1 H 6,93 N 5,10

$R_{fru}$-Wert = 0,08
$[\alpha]_D^{20}$ : $-37^o$ (c=2,1; in Wasser)

1-N-L-Lysin-1-desoxy-$\varepsilon$-D-Fructose-dihydrochlorid.
($\varepsilon$-D-Fructose-L-Lysin-dihydrochlorid).

Die Fraktionen mit der reduzierenden ninhydrinpositiven Substanz wurden vereinigt und aufgearbeitet. Es wurden

6 g Sirup erhalten, der aus methanolischer Lösung gefällt wurde.

$C_{12}H_{26}N_2O_7Cl_2$ ( 381,26 )

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ber.: | C 37,8 | H | 9,1 | N | 7,34 |
| Gef.: | C 37,5 | H | 9,3 | N | 7,0 |

$R_{fru}$-Wert = o,57

$[\alpha]_D^{20}$ : $-28^o$ (c=2,2; in Wasser)

Die Spaltungsversuche wurden in der Weise durchgeführt, daß etwa 5%ige Lösungen der Substanzen in 2 n Essigsäure im Einschlußröhrchen erhitzt wurden. Es wurde zwei bis vier Stunden bei 115°C gehalten. Die Spaltprodukte wurden papierchromatographisch durch Vergleich mit authentischen Stoffen identifiziert.

Prüfung auf Amadori-Produkte (71).

1 ml einer verdünnten Lösung der zuprüfenden Substanz wird mit der gleichen Menge einer 0,1%igen Lösung von $K_3Fe(CN)_6$ in 1n NaOH versetzt und 5 Minuten in einem Eisbad stehengelassen. Anschließend wird 1 ml einer Lösung von 5 g $Fe_2(SO_4)_3$ und 75 ml 85%iger $H_3PO_4$ in 100 ml Wasser versetzt. Bei Amadoriprodukten erhält man eine intensive Blaufärbung.

## I.) Literaturverzeichnis.

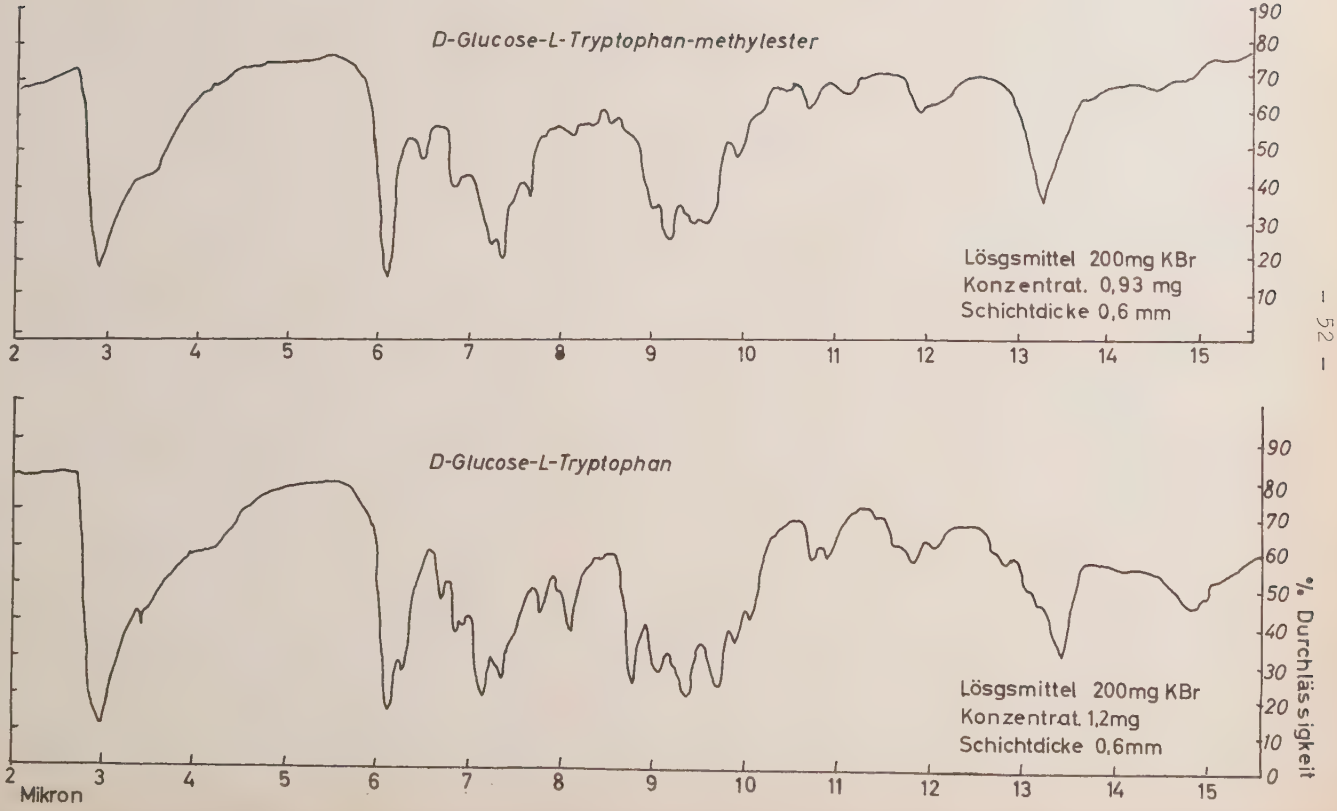

| | | |
|---|---|---|
| 1 | J.E. Hodge | Agricultured Food Chem. 1, 928 (1953) |
| 2 | M.A.Joslyn,J.D.Ponting | Adv.Food Res. 3, 1 (1951) |
| 3 | M.L. Wolfrom, A.Thomson R.B.Ward | J.Amer.chem.Soc. 81, 4623 (1959) |
| 4 | K. Heyns u. K. Pavel | Z.Naturforschg. 12, 97, 109 (1957) |
| 5 | J.P.Danehy u. W.W.Pigman | Adv.Food Res. 3, 241 (1951) |
| 6 | G.P. Ellis | Adv.Carb.Chem. 14,63 (1959) |
| 7 | K. Heyns u. H. Paulsen | Wissenschftl.Veröffentl. der Dtsch.Ges.für Ernähr. Bd.5 Dr.Dietrich Steinkopff Verl. Seite 15 (1960) |
| 8 | L.C. Maillard | Compt.rend. 154,66 (1912) |
| 9 | L.C. Maillard | " 156,1159 (1913) |
| 10 | M.P. Schubert | J.biol.Chem. 130,601 (1939) |
| 11 | G. Agren | Acta physiol.scand. 1, 105 (1940) |
| 12 | A.M.Kuzin u. O.J.Polyakowa | Biokhimiya 6, 113 (1941) |
| 13 | F. Micheel u. A.Klemer | Chem.Ber. 84, 212 (1951) |
| 14 | A. Gottschalck u. S.M. Partridge | Nature 165, 684 (1950) |
| 15 | A. Gottschalck | Biochem.J. 52, 455 (1952) |
| 16 | A. Abrams, P.H. Lowy u. H. Borsook | J.Amer.chem.Soc. 77, 4794 (1955) |
| 17 | P.H. Lowy u. H. Borsook | J.Amer.chem.Soc. 78, 3175 (1956) |
| 18 | K. Heyns u. H. Paulsen | Liebigs Ann. Chem. 622, 160 (1959) |
| 19 | F. Micheel u. A. Klemer | Chem.Ber. 89,1241 (1956) |

| | | |
|---|---|---|
| 20 | F. Micheel u. A.Frohwein | Chem.Ber. 92, 304 (1959) |
| 21 | E.F.L.J. Anet | Austr.J.Chem. 10, 193 (1957) |
| 22 | H. Schroeder | Dissertation Hamburg 1960 |
| 23 | E.F.L.J. Anet | Chem.and Ind. 1438 (1958) |
| 24 | E.F.L.J. Anet | Austr.J.Chem. 13, 396 (1960) |
| 25 | E.F.L.J. Anet | " 12, 280 (1959) |
| 26 | K. Heyns u. H.Breuer u. H.Paulsen | Angew.Chem. 68, 334 (1956) |
| 27 | K. Heyns, H. Breuer u. H. Paulsen | Chem.Ber. 90, 1374 (1957) |
| 28 | K. Heyns u. H. Breuer | " 91, 2750 (1958) |
| 29 | K. Heyns u. M. Rolle | " 92, 2439 (1959) |
| 30 | K. Heyns u. H. Noack | " im Druck |
| 31 | H.H. Baer | Fortsch.Chem. Forschg. 3, 822 (1958) |
| 32 | R. Schumacher | Dissertation Hamburg 1961 |
| 33 | J.E. Hodge | Adv.Carb.Chem. 10, 169 (1955) |
| 34 | F. Weygand | Chem.Ber. 73, 1359 (1940) |
| 35 | J.E. Hodge u. C.E. Rist | J. Amer. chem. Soc. 75, 316 (1953) |
| 36 | B. Helferich u. A. Porck | Liebigs Ann.Chem. 582, 233 (1953) |
| 37 | K.Heyns, H. Paulsen R. Eichstedt, M. Rolle | Chem.Ber. 90, 2039 (1957) |
| 38 | K. Heyns u. K.H.Meinecke | Chem.Ber. 86, 1453 (1953) |
| 39 | K. Heyns, R. Eichstedt u. K.H. Meinecke | " 88, 1551 (1955) |
| 40 | J.F. Carson | J.Amer.chem.Soc 77, 1881 (1955) |

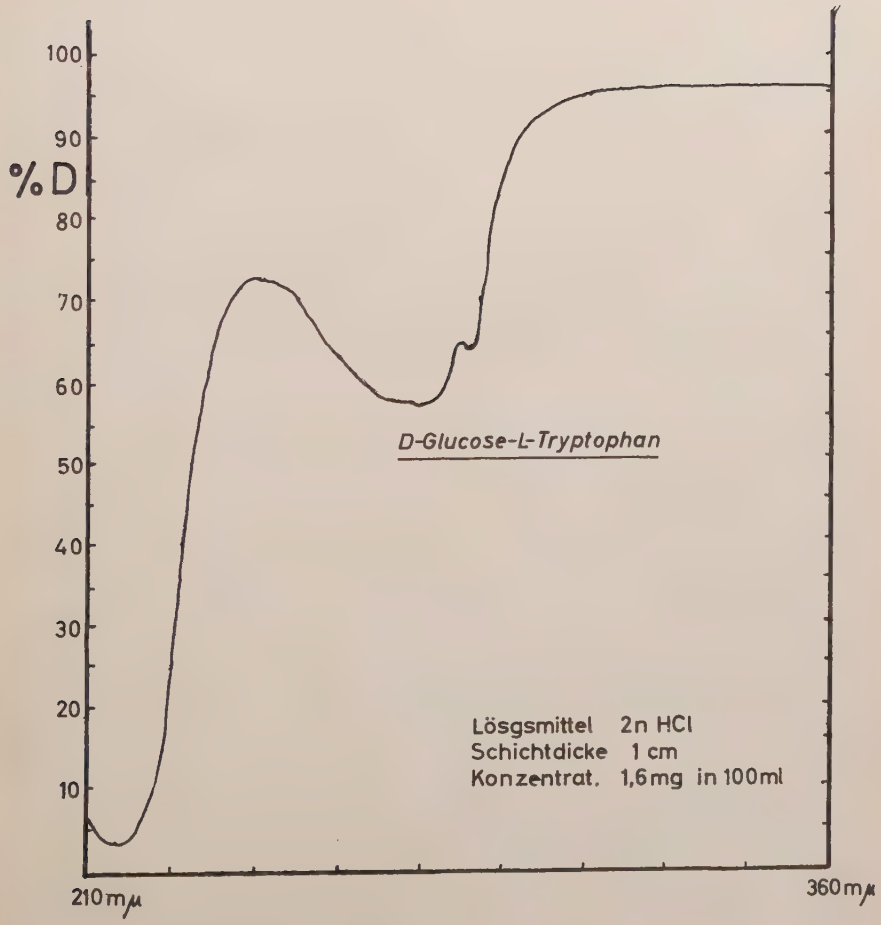
| | | |
|---|---|---|
| 41 | J.F. Carson | J. Amer. chem. Soc. 78, 3728 (1956) |
| 42 | C.P. Barry u. J. Honeyman | J. Chem Soc. (London) 4147 (1952) |
| 43 | K.Maekawa u. K.Ishimoto | C. 34, 11308 (1960), J.chem.Soc. Japan 80, 565, (1959) |
| 44 | | The Enzymes, Vol.I.,Part.II Seite 908 |
| 45 | Hoppe-Seyler-Tierfelder | Handbuch der physiol. u.path.Analyse, 10.Aufl. 3.Bd.,2.Teil, Seite 1708 |
| 46 | W.O. Kermack, W.H.Perkin u. R.Robinson | J. Chem. Soc. (London) 119, 1617 (1921) |
| 47 | H.R. Snyder, G.H. Hansch, L. Katz, S.M. Parmerter u. E.C. Spaeth | J. Amer. chem. Soc. 70, 219 (1948) |
| 48 | W.A. Jacobs u. L.C. Craig | J.biol.Chem. 113, 759 (1935) |
| 50 | D.G. Harvey, E.J. Miller u. W. Robson | J. Chem. Soc. (London) 71, 527 (1949) |
| 51 | R. Tschesche u. H.Jensen | Chem.Ber. 91, 1732 (1958) |
| 52 | K. Heyns u. W. Walter | Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 294, 111 (1954) |
| 53 | R. Tschesche u. H.Jensen | Chem.Ber. 91, 1740 (1958) |
| 54 | A. Neuberger u. F.Sanger | Biochem.J. 37, 515 (1943) |
| 55 | K. Lang | Dtsch.Lebensmittelrsch. 165 (1959) |
| 56 | S. Sentheshanmuganathan u. A.A. Hoover | Biochem.J. 68, 621 (1958) |
| 57 | F. Micheel u. A. Klemer | Chem.Ber. 89, 1238 (1956) 85, 1083 (1952) |
| 58 | K. Heyns u. M. Rolle | Chem.Ber. 92, 2451 (1959) |
| 59 | K. Heyns u. E.Röhrscheidt | (Unveröffentlicht) |

| | | |
|---|---|---|
| 60 | A. Albert, R.Goldacre u. J. Phillips | J. Chem. Soc. (London, 2240 (1948) |
| 61 | B. Neivelt, E.C. Mayo J.H. Tiers, D.H. Smith u. G.W. Wheland | J. Amer. chem. Soc. 73, 3475 (1951) |
| 62 | W. Stumme | Dissertation Hamburg 1956 |
| 63 | K. Heyns u. W. Stumme | Chem.Ber. 89, 2833 (1956) |
| 64 | K. Heyns u. W. Stumme | Chem.Ber. 89, 2844 (1956) |
| 65 | T.G. Bourner | Chem.and Ind. 345 (1960) |
| 66 | P.G.W. Smith | J.chem.Soc.(London) 3985 (1957) |
| 67 | R. Kuhn u. F.Weygand | Chem.Ber. 70, 769 (1937) |
| 68 | M. Rolle | Dissertation Hamburg 1959 |
| 69 | K. Heyns u. W. Walter | Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 287, 15 (1951) |
| 70 | K. Heyns u. G. Anders | " 287, 1 (1951) |
| 71 | A. Abrams, H. Borsook | J.biol.Chem. 215, 111 (1955) |
| 72 | I.M. Hais u. K. Macek | Handbuch der Papierchromatographie Bd.1,S.398 (1958) |

# JR-Spektren


D-Glucose-L-Tryptophan-methylester
Lösgsmittel 200mg KBr
Konzentrat. 0,93 mg
Schichtdicke 0,6 mm
D-Glucose-L-Tryptophan
Lösgsmittel 200mg KBr
Konzentrat 1,2mg
Schichtdicke 0,6mm
Mikron
% Durchlässigkeit

# U V - Spektrum


100
90
%D
80
70
60
50
40
30
20
10
D-Glucose-L-Tryptophan
Lösgsmittel 2n HCl
Schichtdicke 1 cm
Konzentrat. 1,6mg in 100ml
210mμ
360mμ

## Lebenslauf

Als Sohn des Chemikers Dr. Walther Noack und seiner Ehefrau Martha, geb. Müller, wurde ich am 28. Februar 1932 in Belin geboren.

Ostern 1938 kam ich in Düsseldorf in die Volksschule. Nach mehrfachem Schulwechsel, bedingt durch den Beruf meines Vaters und die Kriegsereignisse, erhielt ich im Februar 1953 am Wilhelm-Hittorf-Gymnasium in Münster/ Westf. das Reifezeugnis.

Im SS. 1953 und im WS. 1953/54 studierte ich an der Universität Münster. Ab SS. 1954 war ich in Hamburg immatrikuliert. An der Universität Hamburg bestand ich im Juni 1956 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung und im Juni 1959 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung. Von Juli 1958 bis Mai 1959 arbeitete ich an meiner Diplom-Arbeit über das Thema: "Über die Reaktion zwischen D-Fructose und L-Lysin." Die Arbeit wurde unter der Leitung von Professor Dr. Heyns am Institut für Organische Chemie des Chemischen Staatsinstitutes ausgeführt. Anschließend begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Seit Februar 1960 bin ich mit der Verwaltung der Dienstgeschäfte eines Wissenschaftlichen Assistenten am Institut für Organische Chemie, Hamburg, beauftragt. Im August 1960 habe ich geheiratet.

Folgenden Herren Professoren und Dozenten bin ich für das mir vermittelte Wissen zu Dank verpflichtet:

Bode, Engel, Goos, Heyns, Jantzen, Kappler, Klemm, Knappwost, Koch, Mewius, Meyer, Micheel, Nielsen, Remy, Rosenbohm, Schlubach, Seifert, Specker, Strugger, Tschesche, Walter, Wicke, Zerbe.

Druck: Photo-Copie GmbH Hamburg 1